

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Effets de la 4-Aminopyridine sur le Lymphocyte T Jurkat :
Influx Calcique, Induction de l'Apoptose et Perméation d'Ions

Par

ÉLIE BARBAR

Département de biochimie et Service d'immunologie
Programme d'Études Supérieures en Immunologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine
de l'Université de Sherbrooke
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.) en immunologie

Août 2004



Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-37947-9
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-37947-9

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Effets de la 4-Aminopyridine sur le Lymphocyte T Jurkat : Influx Calcique, Induction de l'Apoptose et Perméation d'Ions

Par Élie Barbar

Département de biochimie et Service d'immunologie, Programme d'études supérieures en immunologie, Thèse présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en immunologie.

Août 2004.

Résumé

La 4-aminopyridine (4-AP) est utilisée dans le traitement expérimental de plusieurs maladies du système nerveux. Son action bénéfique est médiée via le blocage de canaux potassiques, ce qui améliore la transmission de l'influx nerveux ainsi que la force motrice musculaire. Outre sa propriété de bloquer les canaux K^+ , la 4-AP possède plusieurs autres effets cellulaires qui ne sont pas complètement caractérisés. Par exemple, elle alcalinise le milieu intracellulaire, induit une réponse calcique et peut causer la mort cellulaire. Dans une première étude, nous avons utilisé la lignée de lymphocyte T Jurkat E6.1 comme modèle afin de caractériser la réponse calcique induite par la 4-AP, notamment sa modulation par les protéine kinases et les sérine/thréonine protéines phosphatases. Nos résultats ont montré que la 4-AP induisait une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$), d'une manière qui n'obéissait pas au modèle capacitatif. De plus, l'influx de calcium était sensible à la protéine kinase C, à la phosphatase PP1, et non à la protéine kinase A. Une activation de la PKC et/ou une inhibition de PP1 diminuait considérablement l'influx de calcium induit par la 4-AP, d'une façon additive. Dans une deuxième étude, nos travaux ont ciblé le phénomène de mort cellulaire induit par la 4-AP. Une autre propriété du $P2X_7R$ est la formation de protubérances membranaires appelées *blebs*. Nous avons étudié le mécanisme de mort cellulaire induite par la 4-AP chez les cellules T Jurkat. Nos travaux ont montré que la 4-AP induisait la formation de blebs et l'externalisation de la phosphatidylsérine, deux phénomènes précoces de l'apoptose, ainsi que la fragmentation de l'ADN, un phénomène tardif de l'apoptose. Nos résultats ont montré que la 4-AP induisait l'activation des caspase-3, -6 et -9, et non de la caspase-8, ainsi qu'une perte du potentiel membranaire. Ces résultats sont consistants avec l'interprétation que la 4-AP déclenche l'apoptose chez le lymphocyte Jurkat en activant la voie intrinsèque (mitochondriale) de la cascade. Dans une troisième étude, nos travaux se sont adressés à la cible de la 4-AP impliquée dans l'influx de calcium. Cette cible est inconnue mais certains indices obtenus dans notre laboratoire nous ont permis d'établir une cible potentielle de la 4-aminopyridine, soit le récepteur purinergique $P2X_7$ ($P2X_7R$) dont les propriétés liées à la réponse cellulaire coïncident avec celles de la 4-AP. Par exemple, le $P2X_7R$ permet l'entrée de calcium, et forme un pore membranaire permissif à certains ions de grande taille, comme le cation éthidium (314 Da), et non le cation propidium (414 Da). Nous avons montré cette restriction de perméation de cations chez les cellules Jurkat stimulées à la 4-AP, et aussi chez des cellules CHO transfectées avec le $P2X_7R$ de rat, mais pas chez des cellules COS ou HEK transfectées. Ces résultats suggèrent des actions diverses de la 4-AP sur des cibles autres que les canaux potassiques, potentiellement le $P2X_7R$, d'une manière spécifique au type cellulaire.

Mots clés : 4-aminopyridine, calcium, apoptosis, protein kinase C, $P2X_7$.

Dédié à ma famille
et à ma patrie.

Table des matières

Table des matières.....	I
Liste des figures	IV
Liste des tableaux.....	IV
Liste des abréviations.....	V
Introduction.....	1
1. Canaux ioniques lymphocytaires	1
1.1 Canaux K^+	1
1.2 Effets des bloqueurs de canaux K^+ sur la réponse immune	4
2. 4-Aminopyridine: Synthèse et propriétés physico-chimiques	5
2.1 Utilisations des dérivés aminopyridine	5
2.2 Mode d'action des aminopyridines	8
2.3 Toxicité de la 4-AP	9
3. Mobilisation calcique et modèle capacitatif	10
3.1 Modèles proposés pour le CCE.....	11
3.2 Voies indépendantes d'influx de Ca^{2+}	14
3.3 Récepteurs à la ryanodine	14
3.4 Canal CRAC	16
3.5 Canaux TRP	17
3.6 Le second messenger Ca^{2+}	18
3.7 PMCA et SERCA	19
4. Protéine kinase C	20
4.1 Régulation des isoformes de la PKC par les phospholipides.....	21

4.2 Régulation des isoformes de la PKC par le calcium.....	25
4.3 Rôles des isoformes de la PKC.....	25
4.4 Rôle de la PKC et des protéines phosphatases dans la réponse calcique.....	26
5. Mort cellulaire.....	27
5.1 Caspases.....	30
5.1.1 Activation des caspases : protéolyse de zymogènes.....	33
5.1.2 Activation des caspases : induction proximale.....	33
5.1.3 Activation des caspases : association avec une sous-unité régulatrice.....	35
5.1.4 Régulation des caspases par les IAP.....	37
5.2 Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.....	37
5.3 Éléments précoces de l'apoptose.....	40
5.4 Éléments tardifs de l'apoptose.....	41
6. Récepteurs purinergiques.....	42
6.1 Récepteurs P2X.....	44
6.2 Récepteur P2X ₇	45
6.2.1 Pore cytolytique formé par le P2X ₇ R.....	47
6.2.2 Effets cytotoxiques associés avec l'activation du P2X ₇ R.....	48
6.2.3 Antagonistes et bloqueurs du P2X ₇ R.....	48
7. Objectifs du projet.....	51
Manuscrit I.....	52
Manuscrit II.....	53
Manuscrit III.....	55
8. Discussion.....	57

8.1 Régulation de l'influx calcique induit par la 4-AP	57
8.2 Effet de PKC et de PP1	58
8.3 Cible calcique de la 4-AP : CRAC ou TRP ?	59
8.4 Mort cellulaire par la 4-AP	60
8.5 Pores de perméabilité mitochondriale.....	61
8.6 Fusion cellulaire et formation de pore	62
8.7 Effet de 4-AP chez les lymphocytes périphériques	63
8.8 4-AP et sclérose en plaques : Mécanismes cliniques.....	64
8.9 Cytolyse versus apoptose.....	66
8.10 4-AP et immunosuppression.....	68
8.11 Perspectives concernant les cellules T Jurkat	69
8.12 Mécanisme hypothétique global de la 4-AP	71
Remerciements.....	72
Bibliographie.....	74

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique et classification structurale des sous-unités des canaux K^+	3
Figure 2. Structure de quelques dérivés de la pyridine possédant une activité biologique. 6	
Figure 3. Mécanismes proposés pour l'entrée capacitative de calcium.....	13
Figure 4. Structure et domaines des PKC	22
Figure 5. Représentation schématique des deux modes de régulation des PKC	24
Figure 6. Représentation schématique du continuum entre les diverses cascades de la mort cellulaire	29
Figure 7. Organisation structurale et fonctionnelle des caspases	34
Figure 8. Structure tridimensionnelle de l'apoptosome lié à la procaspase-9.	36
Figure 9. Rôle des IAPs dans la régulation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	38
Figure 10. Schématisation de la topologie membranaire des sous-unités des récepteurs P2X et P2Y	43
Figure 11. Structures de divers antagonistes des récepteurs purinergiques P2X.....	50

Liste des tableaux

Tableau 1. Éléments comparatifs de l'apoptose et de la nécrose.....	28
Tableau 2. Sommaire des propriétés des caspases, leurs substrats et leurs fonctions	31

Liste des abréviations

$\Delta\Psi_m$	Potentiel membranaire mitochondrial
aa	Acide aminé
AP	Aminopyridine
BBG	Brilliant Blue G
BzATP	2'-3'-O-(4-Benzoylbenzoyl)-ATP
$[Ca^{2+}]_i$	Concentration de calcium intracellulaire
CAD	DNase activée par les caspases (<i>Caspase activated DNase</i>)
cADPR	ADP-ribose cyclique
CCE	Entrée capacitative de calcium (<i>Capacitative calcium entry</i>)
CGM	Cellules géantes multinucléées
CIF	Facteur d'influx de Ca^{2+} (<i>Ca²⁺-influx factor</i>)
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CRAC	Canal activé par la relâche de calcium (<i>Calcium Release-Activated Calcium channel</i>)
DAG	Diacylglycérol
DAP	Diaminopyridine
EAE	Encéphalomyélite autoimmune expérimentale
IAP	Protéine inhibitrice de l'apoptose (<i>Inhibitor of apoptosis</i>)
ICIA	Influx de Ca^{2+} induit par la 4-AP
IFN	Interféron
IL	Interleukine
InsP3	Inositol (1,4,5)-trisphosphate

InsP3R	Récepteur de l'InsP3
P2X ₇ R	Récepteur purinergique P2X ₇
PBL	Lymphocytes périphériques humains (<i>Peripheral blood lymphocytes</i>)
PE	Phosphatidyléthanolamine
PHA	Phytohémagglutinine
PKC	Protéine kinase dépendante du Ca ²⁺
PLC	Phospholipase C
PMCA	Ca ²⁺ ATPase de la membrane plasmique (Plasma Membrane Ca ²⁺ ATPase)
PS	Phosphatidylsérine
PTP	Pore de transition de perméabilité
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
S/T PPase	Sérine et thréonine protéine phosphatase
SERCA	Ca ²⁺ ATPase du réticulum sarco/endoplasmique (<i>Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase</i>)
SNC	Système nerveux central
SOC	Canal opéré par les réserves (<i>Store-operated channel</i>)
TCR	Récepteur de cellules T (<i>T cell receptor</i>)
TEA	Tétraéthylammonium
TNF	Facteur de nécrose tumorale (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TNFR	Récepteur du TNF
TRP	Récepteur de potentiel transitoire (<i>Transient receptor potential</i>)

Introduction

1. Canaux ioniques lymphocytaires

Le développement de la technique de *patch clamp* par Neher et Sakman (prix Nobel en 1991) (RAJU, 2000) a permis d'étudier les propriétés électrophysiologiques des canaux ioniques dans une variété de types cellulaires. Cette technique permet de mesurer des courants membranaires avec une résolution unitaire de canaux sur une échelle de la milliseconde. Les canaux ioniques sont classés selon leur perméabilité à certains ions. Ainsi, des canaux sélectifs pour le K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- et H^+ ont été identifiés chez diverses cellules (CAHALAN *et al.*, 2001). Il existe plusieurs types de canaux K^+ . Les deux types de canaux les plus étudiés chez le lymphocyte T sont les canaux K^+ et Ca^{2+} . L'existence de canaux Kv voltage-dépendants chez les lymphocytes T, qui sont des cellules électriquement non-excitables, a permis de mettre à profit l'utilisation de bloqueurs de ces canaux afin d'en étudier leur fonction. Des bloqueurs de canaux K^+ neuronaux, comme la 4-aminopyridine (4-AP), le tétraéthylammonium (TEA) et la quinine bloquent l'activité des canaux K^+ lymphocytaires à des concentrations micromolaires et millimolaires, inhibant ainsi la prolifération lymphocytaire mesurée par l'incorporation de 3H -thymidine (DECOURSEY *et al.*, 1984).

1.1 Canaux K^+

Le rôle fondamental de tous les canaux K^+ est la conductance des ions K^+ à travers la membrane plasmique, selon un gradient électrochimique à un taux de 10^6 à 10^8 ions par seconde. Le rayon atomique du K^+ est de 1.33 Å, tandis que celui du Na^+ est de

0.95 Å. Malgré cette différence de rayon atomique, les canaux K^+ sélectionnent l'ion K^+ plutôt que l'ion Na^+ par un facteur de plus de 1000. De plus, cette sélectivité élevée est atteinte sans interférer sur les taux de conduction lesquels se rapprochent des limites de la diffusion (MACKINNON, 2003).

Les canaux K^+ sont classés selon la séquence primaire du domaine protéique contenant le pore (SHIEH *et al.*, 2000). Des études cristallographiques ont permis d'établir la structure tridimensionnelle de plusieurs des canaux K^+ (MACKINNON, 2003). Les canaux K^+ peuvent être composés de six segments transmembranaires. Cette catégorie inclut les canaux K^+ régulés par le voltage. Ceux-ci sont assemblés en quatre sous-unités dont chacune contient six segments transmembranaires (S1-S6), un pore conducteur (P) situé entre les segments S5 et S6, et un senseur de voltage (charge positive d'acides aminés) situé dans le segment S4 (Figure 1A). Quelques canaux K^+ voltage-dépendants comprennent aussi une sous-unité β auxiliaire ($Kv\beta$), qui est une protéine cytoplasmique se liant à l'extrémité N-terminale de la sous-unité α du canal. La structure à deux segments transmembranaires (Figure 1B) des canaux K^+ comprend les canaux K^+ rectifiants entrants (Kir) et le I_{Ach} (*muscarine-activated K^+ current*) dont chacun contient deux segments transmembranaires (M1 et M2) avec un pore entre les deux. Finalement, la structure à quatre segments transmembranaires (Figure 1C) constitue une classe à quatre domaines transmembranaires ayant deux pores.

Les canaux K^+ jouent un rôle important dans les voies de signalisation menant à la prolifération, la différenciation et la fusion cellulaire. Une activité élevée des canaux K^+ ainsi qu'un efflux accru de K^+ sont requis pour maintenir une hyperpolarisation membranaire nécessaire pour faciliter l'entrée de Ca^{2+} (SANTELLA, 1998). De plus, le

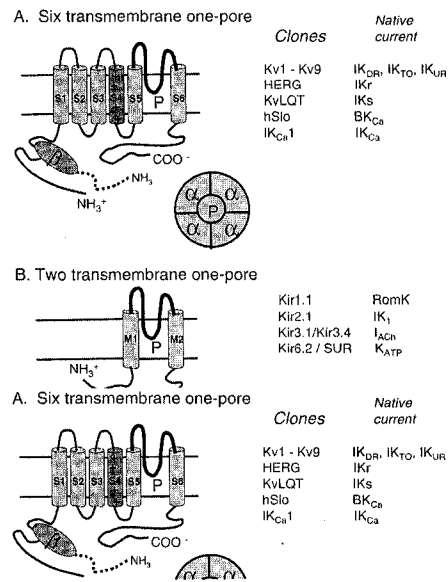


Figure 1. Représentation schématique et classification structurale des sous-unités des canaux K^+

A) Canaux à six domaines transmembranaires et un pore. Le canal K^+ est homotétramérique et formé par quatre sous-unités α identiques, tandis que des sous-unités α différentes forment des canaux K^+ hétérotétramériques. Quelques canaux illustrent cette catégorie, dont le IK_{DR} (*delayed rectifying K^+ current*), le IK_{TO} (*transient outward delayed rectifier*), le IK_{UR} (*ultrarapid delayed rectifier*), le Ikr (*cardiac rapid delayed rectifier*), le Iks (*cardiac slow delayed rectifier*) et le IK1 (*inward rectifier*). B) Canaux à deux domaines transmembranaires et un pore, représentés par les canaux K^+ rectifiants entrants (Kir) et le I_{ACh} (*muscarine-activated K^+ current*). C) Canaux à quatre domaines transmembranaires et deux pores. Cette catégorie est illustrée par des canaux tel que le TWIK (*two-pore weak inward rectifier*), le TASK (*TWIK-related acid-sensitive K^+ channel*) et le TRAAK (*TWIK-related arachidonic acid-stimulated K^+ channel*). (SHIEH *et al.*, 2000)

contrôle du volume cellulaire peut être impliqué dans la prolifération cellulaire (ROUZAIRE-DUBOIS et DUBOIS, 1998 ; VAUR *et al.*, 1998) et l'apoptose chez les cellules immunitaires (GOMEZ-ANGELATS *et al.*, 2000).

1.2 Effets des bloqueurs de canaux K^+ sur la réponse immune

Il existe une grande variété de bloqueurs de canaux K^+ (SHIEH *et al.*, 2000) dont certains possèdent la propriété de moduler l'activation (KOO *et al.*, 1997 ; BEETON *et al.*, 2001a) et la prolifération lymphocytaires (JENSEN *et al.*, 1999). Par conséquent, l'inhibition des canaux K^+ par des agents pharmacologiques interfère avec la prolifération des lymphocytes humain normaux, des cellules de mélanome humain, des cellules de cancer pulmonaire, des cellules du cancer du sein ainsi que des cellules de la prostate (SHIEH *et al.*, 2000). Par exemple, la margatoxine, un bloqueur du canal potassique Kv1.3, inhibe l'hypersensibilité retardée à médiation cellulaire (type IV) et la réponse humorale induite par une stimulation allogénique chez les mini-porcs, tandis qu'une exposition prolongée empêche le développement des cellules T dans le thymus (KOO *et al.*, 1997). D'autres bloqueurs, tels que la quinine, la 4-AP et le TEA inhibent la synthèse de l'interleukine-2 (IL-2) chez les lymphocytes stimulés par la PHA (AUSSEL *et al.*, 1990), l'activation et la prolifération (DECOURSEY *et al.*, 1984), ainsi que la production des cytokines IL-2 et interféron γ (IFN- γ) (LIN *et al.*, 1993). L'ensemble de ces résultats suggère que les canaux K^+ sont impliqués dans les réponses des lymphocytes T. De plus, le TEA peut altérer la signalisation calcique dans la maladie d'Alzheimer en réduisant et retardant la réponse calcique lymphocytaire (BONDY *et al.*, 1996), en plus de bloquer l'activité cytotoxique des cellules NK (*natural killer*) (WITKOWSKI *et al.*, 1993).

2. 4-Aminopyridine: Synthèse et propriétés physico-chimiques

La 4-AP (Figure 2), dont la formule chimique est $C_5H_6N_2$, possède une masse moléculaire de 94.1 g/mol et un pK_a de 9.11. La production commerciale de 4-AP se fait en deux étapes à partir de la pyridine et du chlorure de chlorhydrate de 1-(4-pyridyl)pyridinium comme intermédiaire (BULAVKA et BOIKO, 2000). Cette procédure donne un rendement de 36-40%. Cependant, une synthèse à l'échelle semi-préparative est préférable et se fait en trois étapes. Elle inclue de l'oxyde de *N*-pyridine et de l'oxyde de *N*-4-nitropyridine comme intermédiaires. La dernière étape consiste en l'oxydation de la *N*-4-nitro-pyridine par l'ion ferrique en milieu acide acétique sous reflux, produisant ainsi de la 4-aminopyridine avec un rendement de 65%.

2.1 Utilisations des dérivés aminopyridine

La 4-AP et ses dérivés (Figure 2) ont un vaste champ d'application. Ces composés sont utilisés comme agents thérapeutiques dans le traitement expérimental de plusieurs désordres neurologiques. Par exemple, les effets bénéfiques consistent à réduire les symptômes de formes légères de la sclérose en plaques (POLMAN *et al.*, 1994a ; POLMAN *et al.*, 1994b ; SCHWID *et al.*, 1997 ; FUJIHARA et MIYOSHI, 1998 ; ROSSINI *et al.*, 2001), de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) (BEETON *et al.*, 2001a ; BEETON *et al.*, 2001b), de la myasthénie sévère (LI et ZHANG, 1994), de la maladie motoneuronale du modèle canin (PINTER *et al.*, 1997) et de la maladie d'Alzheimer (ANDREANI *et al.*, 2000). De plus, la 4-AP a été associée avec l'amélioration et le recouvrement partiel des fonctions motrices et sensorielles chez les patients atteints d'une blessure de la moëlle épinière (SEGAL *et al.*, 1999).

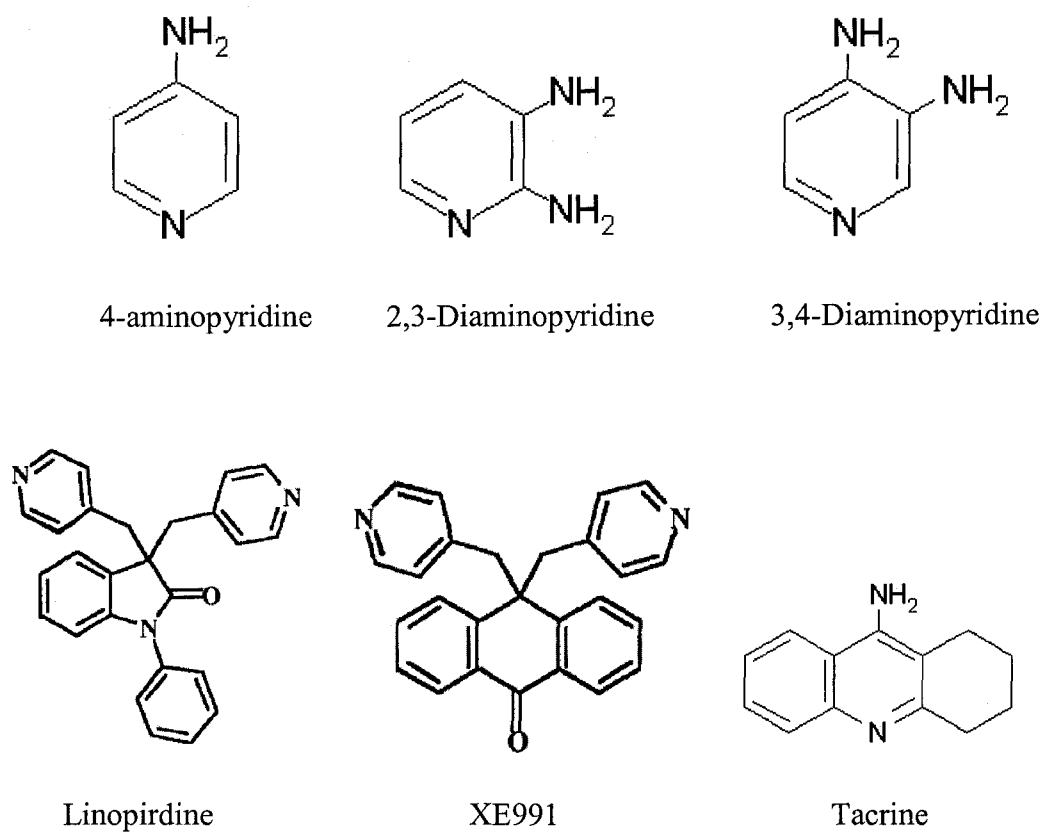


Figure 2. Structure de quelques dérivés de la pyridine possédant une activité biologique.

Dans tous ces cas, les effets bénéfiques ont été attribués au blocage des canaux K^+ , ce qui induit une dépolarisation neuronale, un renforcement de la neurotransmission et une augmentation de la tension du muscle squelettique (SMITH *et al.*, 2000).

La 4-AP et ses dérivés possèdent des propriétés antiamnésiques améliorant ainsi la cognition (ANDREANI *et al.*, 2000). Un de ces dérivés, la tacrine, a été la première drogue approuvée par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour le traitement symptomatique de formes légères de désordres cognitifs associés avec la maladie d'Alzheimer (ANDREANI *et al.*, 2000). Aussi, la 4-AP et la linopirdine ont été évaluées cliniquement pour leur efficacité d'accentuer la relâche du neurotransmetteur acétylcholine (ANDREANI *et al.*, 2000). De fait, la 4-AP et ses analogues structuraux exercent indirectement une action neurologique par l'augmentation de la relâche de plusieurs neurotransmetteurs (acétylcholine, noradrénaline, dopamine et sérotonine) (BRANDSGAARD *et al.*, 2000). D'autre part, la 4-AP peut lier directement, à haute concentration, plusieurs récepteurs neurologiques tels que les récepteurs noradrénergique, sérotonergique, dopaminergique et muscarinique (DRUKARCH *et al.*, 1989).

Le dérivé 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP) possède des propriétés très similaires à celles de la 4-AP (structure chimique, $pK_a = 9.12$) et a été utilisé pour le traitement de cas d'empoisonnement au botulisme sévère (DOCK *et al.*, 2002), du syndrome myasthénique de Lambert-Eaton (MOLGO et GUGLIELMI, 1996) ou comme agent alternatif dans le traitement de la sclérose en plaques. Cependant, la 4-AP est plus efficace et comporte moins d'effets secondaires que la 3,4-DAP (POLMAN *et al.*, 1994a). De plus, la 4-AP peut être utilisée comme antidote dans l'intoxication à la saxitoxine, un poison produit par des dinoflagellés marins (CHEN *et al.*, 1996 ; BENTON *et al.*, 1998), ainsi que la

rémission rapide (quelques minutes) d'une dépression cardio-respiratoire causée par la saxitoxine ou la tétrodoxine, une toxine bactérienne (CHANG *et al.*, 1996). Outre son effet bloqueur sur les canaux K^+ , la 4-AP induit une mobilisation calcique chez plusieurs types cellulaires, tels les astrocytes, les neurones, les cellules musculaires (GRIMALDI *et al.*, 2001) et les lymphoblastes T Jurkat $CD4^+$ (GUSE *et al.*, 1994). Cependant, le mécanisme de cette mobilisation de Ca^{2+} reste indéterminé.

2.2 Mode d'action des aminopyridines

Les aminopyridines sont des bases faibles, dont le pKa varie entre 6 et 9, qui peuvent exister sous une forme neutre ou protonée au pH physiologique (MOLGO *et al.*, 1985). Elles bloquent les canaux K^+ voltage-dépendants, supprimant ainsi l'efflux de K^+ , ce qui maintient le potentiel d'action et entraîne une augmentation de l'influx nerveux (MOLGO *et al.*, 1985). Les aminopyridines agissent sous la forme cationique, tel que suggéré par les études sur la membrane axonale du calmar (KIRSCH et NARAHASHI, 1983) et sur le canal potassique transitoire cardiaque Kv1.4 (RASMUSSEN *et al.*, 1995). On a proposé que la 4-AP traverse la membrane plasmique sous sa forme neutre, pour ensuite agir de l'intérieur de la cellule sous la forme protonée. D'ailleurs, on a montré que la 4-AP pouvait traverser la barrière hémato-encéphalique (LEMEIGNAN *et al.*, 1984) et affectait l'activité des canaux K^+ dans les cellules de neuroblastome à une concentration moindre lorsqu'elle est appliquée de l'intérieur plutôt que de l'extérieur de la cellule (HIRSH et QUANDT, 1993). Un modèle physico-mathématique de l'action des aminopyridines, sous leur forme protonée suggère que le noyau pyridine joue un rôle actif dans l'interaction avec leur site de liaison sur les canaux K^+ . Cette interaction avec l'azote pyridinique protoné pourrait être le résultat d'interactions cation- π ou la formation

d'un pont hydrogène donneur (NIÑO *et al.*, 2003). Quant aux groupements amines, présents sur différentes positions du noyau pyridine, ils peuvent former un ou plusieurs ponts hydrogène étant donné la symétrie de la région C₄ de la partie intérieure du canal K⁺ (NIÑO *et al.*, 2003). Un modèle récemment proposé suggère que le site sélectif de transport cationique du canal soit formé d'une structure quaternaire (*fourfold*), symétrie C₄, de résidus donneurs/accepteurs de protons, situés dans le pore du canal K⁺ (MUÑOZ-CARO et NIÑO, 2002). Enfin, les aminopyridines possèdent une plus grande affinité pour les canaux K⁺ dans leur état ouvert (activé) (YAMANE *et al.*, 1995).

2.3 Toxicité de la 4-AP

Outre les effets bénéfiques de la 4-AP, cette dernière est toxique à des doses élevées. En effet, elle est utilisée comme avicide sous les nom commerciaux Avitroland™ et Avitrol 200™. L'Avitrol™ chasse les oiseaux suite à l'intoxication de quelques membres du groupe, les rendant hyperactifs. Leurs cris de détresse incitent les autres oiseaux à quitter les lieux et il suffit de quelques oiseaux intoxiqués pour alarmer le reste du groupe. Généralement, une seule exposition suffit pour éloigner les oiseaux des lieux traités. La 4-AP peut être toxique non seulement pour les oiseaux, mais pour une multitude de mammifères (SCHAFER *et al.*, 1973). Elle peut diffuser faiblement à travers la peau (sans accumulation cutanée) et, chez l'humain, une dose supérieure à 60 mg peut être toxique. Les symptômes d'un empoisonnement sont : sensation de soif, nausée, faiblesse générale et sudation intense qui peuvent être suivis par une psychose toxique, perte de coordination musculaire, tremblements, convulsions, difficulté respiratoire, crise d'épilepsie, déficience respiratoire et arrêt cardiaque (SPYKER *et al.*, 1980).

3. Mobilisation calcique et modèle capacitatif

Une des étapes essentielles dans l'activation des lymphocytes T est la mobilisation calcique (CARDENAS et HEITMAN, 1995 ; LEWIS et CAHALAN, 1995 ; GUSE, 1998). L'élévation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} suite à l'exposition des lymphocytes T à un stimulus mitogénique ou antigénique se caractérise par deux phases distinctes. La phase initiale est le résultat de la vidange des réserves internes de Ca^{2+} et est suivie d'une phase stationnaire produite par un influx transmembranaire de Ca^{2+} . Putney a proposé un modèle permettant de lier les deux événements (PUTNEY, 1986). Suivant ce modèle, la vidange des réserves calciques génère un signal d'induction de l'influx de Ca^{2+} . Le modèle est connu sous le nom d'entrée capacitative de calcium (CCE). Les canaux impliqués dans l'influx de Ca^{2+} extracellulaire sont appelés SOC (*store-operated channel*) dont la classe retrouvée chez le lymphocyte T est le CRAC (BERRIDGE *et al.*, 2000a ; LEWIS, 2001) (voir section 3.4). Bien que les SOC soient responsables de l'entrée de Ca^{2+} chez les cellules non-excitables, on a récemment mis en évidence la présence d'un canal calcique voltage-dépendant chez le lymphocyte T qui pourrait participer à la signalisation calcique (KOTTURI *et al.*, 2003).

Un phénomène CCE est typiquement illustré lors de l'activation du lymphocyte T. L'engagement du récepteur de cellules T (TCR) par un antigène présenté par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) entraîne la formation du signalosome et le recrutement de protéines tyrosine kinases et de substrats du complexe TCR/CD3. Cette cascade d'activation induit la phosphorylation et l'activation de la phospholipase $\text{C}\gamma$ ($\text{PLC}\gamma$) qui clive le phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate pour générer le diacylglycérol (DAG) qui est reconnu par les protéines possédant un domaine de

liaison de DAG dont certaines isoformes de la PKC et l'activateur RasGRP. L'activation des PKC DAG-dépendante et les voies dépendantes de Ras sont essentielles à la réponse des lymphocytes T. L'autre produit découlant du clivage du phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate est l'inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP3) qui active son récepteur InsP3R (MIKOSHIBA, 1993) présent au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Il existe trois isoformes de l'InsP3R (I, II et III). Bien que ces récepteurs soient assemblés en homotétramères, on a trouvé récemment par des expériences de co-immunoprécipitation qu'ils pouvaient s'associer en hétérotétramères fonctionnels dans plusieurs types et lignées cellulaires (MONKAWA *et al.*, 1995 ; WOJCIKIEWICZ et HE, 1995 ; NUCIFORA *et al.*, 1996). L'occupation de l'InsP3R entraîne la relâche initiale (phase transitoire) de Ca^{2+} à partir des réserves internes (BERRIDGE, 1995). La vidange des réserves de Ca^{2+} active les SOC et l'influx de Ca^{2+} subséquent. La phase d'influx calcique peut se maintenir pendant plus d'une heure et dépend de l'ADP-ribose cyclique (cADPR) (GUSE *et al.*, 1999). Le maintien de l'influx calcique est essentiel pour l'expression de plusieurs gènes (DOLMETSCH *et al.*, 1998 ; HEALY *et al.*, 1998 ; FESKE *et al.*, 2001) dont ceux impliqués dans la production de l'IL-2 (ABBAS *et al.*, 2000 ; LEWIS, 2001) et la prolifération cellulaire.

3.1 Modèles proposés pour le CCE

Quelques modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme du CCE (Figure 3). Un des modèles implique un messager diffusible appelé CIF (*Ca²⁺-influx factor*) (RANDRIAMAMPITA et TSIEN, 1993) capable d'activer les SOC (SMANI *et al.*, 2004). Suite à une décharge des réserves, le facteur diffusible CIF est relâché du RE et active des SOC présents à la membrane plasmique (Figure 3A). Cependant, deux

problèmes découlent des données actuelles sur le CIF. Premièrement, le CIF est relativement stable quand il est injecté chez les oocytes (CSUTORA *et al.*, 1999, contrairement à sa dégradation rapide (perte de 50% de son activité après 3 min) observée chez les cellules 1321N1 d'astrocytome et les lymphocytes T Jurkat (RANDRIAMAMPITA et TSIEN, 1995). Deuxièmement, les canaux activés par le CIF chez ces cellules sont insensibles au La^{3+} alors que les SOC endogènes le sont (CSUTORA *et al.*, 1999). Deux autres modèles sont basés sur des interactions directes entre la membrane plasmique et les structures sous-jacentes. Le modèle d'exocytose (Figure 3B) propose que les canaux SOC sont initialement associés à des vésicules qui s'insèrent dans la membrane plasmique par fusion suite à la déplétion des réserves de Ca^{2+} (FASOLATO *et al.*, 1993). Cependant, ce modèle n'explique pas comment ce processus peut être couplé à la déplétion des réserves (PUTNEY *et al.*, 2001). Ensuite, le modèle de régulation des canaux Ca^{2+} (Figure 3C) propose un contrôle des SOC par la concentration de Ca^{2+} présente dans le voisinage immédiat des canaux (PUTNEY, 1986). Dans ce modèle, le Ca^{2+} déchargé d'une réserve pleine garde les canaux dans un état inhibé ; la vidange des réserves enlève la source de l'inhibition par le Ca^{2+} , activant ainsi un influx calcique. Enfin, dans le modèle du couplage conformationnel (Figure 3D), la décharge du Ca^{2+} à partir des réserves induit un changement de conformation de l'InsP3R qui se transmet aux canaux Ca^{2+} présents sur la membrane plasmique par une interaction directe protéine-protéine. De plus, les canaux présents dans des vésicules peuvent interagir avec l'InsP3R, tel que stipulé par le modèle de couplage conformationnel (PUTNEY, 1999) qui est le modèle favori présentement (PUTNEY *et al.*, 2001). L'argument majeur contre le couplage conformationnel provient d'expériences sur les

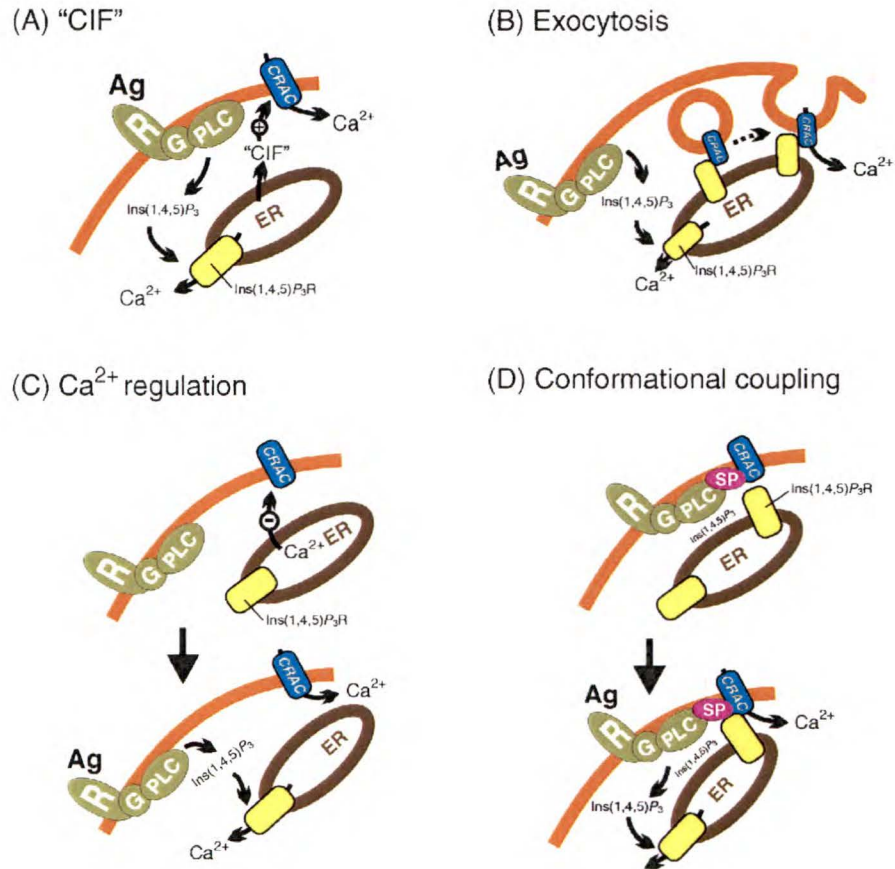


Figure 1. Mécanismes proposés pour l'entrée capacitative de calcium.

L'activation d'un récepteur par un agoniste résulte en une production d'InsP₃, suivie d'une décharge du Ca²⁺ à partir des réserves cellulaires. A) Modèle du facteur diffusible. B) Modèle d'exocytose. C) Modèle de régulation par la concentration de Ca²⁺. D) Modèle du couplage conformationnel.

Abréviations: R, récepteur agoniste; Ag, agoniste; G, protéine G hétérotrimérique; SP, protéine d'échaffaudage. (PUTNEY *et al.*, 2001)

cellules B DT40 où les gènes des trois isoformes d'InsP3R ont été invalidés. Dans ces cellules, le CCE stimulé par la thapsigargine était normal et n'était pas affecté par l'absence des InsP3R (SUGAWARA *et al.*, 1997). Par conséquent, le vrai mécanisme d'activation du CRAC reste débattu.

3.2 Voies indépendantes d'influx de Ca^{2+}

En outre, la stimulation du complexe TCR/CD3 résulte en une activation d'une ADP-ribosyl cyclase soluble ainsi qu'une augmentation maintenue des niveaux de cADPR intracellulaire qui dure plus que 60 minutes (GUSE *et al.*, 1999) et qui corrèle avec des mouvements calciques internes dépendants de la présence du Ca^{2+} extracellulaire (GUSE *et al.*, 1997). Il existe des voies indépendantes du TCR pouvant activer la mobilisation calcique, notamment les intégrines qui activent un influx de Ca^{2+} chez les cellules Jurkat (RICARD *et al.*, 1997b ; WEISMANN *et al.*, 1997). En plus, le gonflement cellulaire hypo-osmotique et l'activation de canaux purinergiques par l'ATP provoquent deux modes d'influx calcique différents chez les thymocytes de souris (ROSS et CAHALAN, 1995 ; ROSS *et al.*, 1997). Ces voies semblent être distinctes des canaux CRAC et leurs rôles dans la physiologie du lymphocyte T ne sont pas connus.

3.3 Récepteurs à la ryanodine

Les niveaux d'InsP3 reviennent à un niveau presque basal après 10 minutes d'exposition des lymphocytes T à une stimulation via le TCR (GUSE *et al.*, 1993). Afin d'expliquer l'influx calcique maintenu pendant plus d'une heure, les travaux de Guse *et al.* ont mis en évidence la contribution du récepteur à ryanodine (RyR) dans la relâche du Ca^{2+} interne par l'action du second messager cADPR. Le RyR est un canal ionique

présent sur la membrane du RE et du réticulum sarcoplasmique et qui est composé de quatre sous-unités identiques d'environ 560 kDa (HOHENEGGER *et al.*, 1999). Le RyR est sensible à la ryanodine (IMAGAWA *et al.*, 1987 ; ROUSSEAU *et al.*, 1987), un alcaloïde paralysant du muscle, et à la caféine (GUSE *et al.*, 1995 ; GUSE *et al.*, 1997 ; RICARD *et al.*, 1997a ; GUSE *et al.*, 1999), mais peu aussi être affecté par un éventail d'agents comme la sphingosine, le dithiothréitol, le perchlorate, le rouge de rhuténium, le verapamil et les toxines de scorpion (CORONADO *et al.*, 1994). Il existe au moins trois sous-types distincts clonés du RyR. Le RyR spécifique pour le muscle squelettique (RyR1) ainsi que le RyR présent dans le cœur et le cervelet (RyR2) sont deux isotypes restreints aux cellules excitables, mais un troisième isotype a été cloné (RyR3) et se retrouve également dans le cerveau (HAKAMATA *et al.*, 1992 ; NAKASHIMA *et al.*, 1997). Toutefois, on a montré la présence individuelle de chacun des trois isoformes de RyR chez des cellules non-excitables, telles que PC-12, HL-60, fibroblastes humains, et la lignée hépatocytaire humaine PLC/PRF/5 (LARINI *et al.*, 1995). Aussi, on retrouve les RyR chez les cellules du système immunitaire, notamment les lymphocytes et les cellules hématopoïétiques (HOSOI *et al.*, 2001), le lymphocyte T Jurkat (RICARD *et al.*, 1997a ; HOHENEGGER *et al.*, 1999) et le lymphocyte murin (BOURGUIGNON *et al.*, 1995). Contrairement aux InsP3R, seulement un isotype du RyR est exprimé chez les lymphocytes, soit le RyR1 (lymphocytes B) et le RyR3 (lymphocytes T) (GRAFTON et THWAITE, 2001). Au fait, un *knock-down* du gène du RyR3 abolit la phase soutenue de la réponse calcique suite à l'activation du lymphocyte T par le complexe TCR/CD3 (SCHWARZMANN *et al.*, 2002), ce qui est un élément important dans la survie cellulaire, car le RyR stimule la prolifération des lymphocytes T humains *in vitro*

(HAKAMATA *et al.*, 1994). Quant à leur distribution tissulaire, les RyR sont exprimés d'une façon quasi ubiquiste (ROSSI et SORRENTINO, 2002). On les retrouve notamment dans les muscles squelettique et cardiaque, l'aorte, l'œsophage, la surrénale, l'intestin grêle, les poumons (LEDBETTER *et al.*, 1994) et la rate (RyR3) (UEHARA *et al.*, 2004).

3.4 Canal CRAC

Dès le début des études de *patch clamp* sur les lymphocytes, les chercheurs ont tenté d'identifier des canaux d'influx calcique semblables à ceux retrouvés chez les cellules excitables, tels les neurones et les cellules du muscle cardiaque. Cependant, des études en imagerie ont clairement montré qu'un influx calcique était déclenché par des lectines mitogéniques, comme la phytohémagglutinine (PHA) (CAHALAN *et al.*, 2001). Un canal de faible conductance, hautement sélectif aux ions Ca^{2+} et activable par la PHA a été décrit par Lewis et Cahalan (LEWIS et CAHALAN, 1989). Plus tard, une conductance similaire a été retrouvée chez les mastocytes et le canal responsable de cette conductance a été nommé le canal CRAC (*Calcium Release-Activated Calcium channel*) (HOTH et PENNER, 1993). Les canaux CRAC sont activés indirectement par des stimuli causant la déplétion de Ca^{2+} des réserves internes. De tels stimuli sont l'InsP3, l'ionomycine et les inhibiteurs des pompes SERCA (voir section 0) comme la thapsigargine. Le canal CRAC, dont les phénotypes physiologiques sont très bien définis (LEWIS et CAHALAN, 1989 ; HOTH et PENNER, 1992 ; HOTH et PENNER, 1993) transporte un courant de faible amplitude mais de grande capacité de Ca^{2+} vers l'intérieur de la cellule. Le groupe de McDonald a récemment montré que le transporteur de calcium intestinal CaT1 (CUI *et al.*, 2002 ; SCHINDL *et al.*, 2002) possédait des propriétés de

conduction similaires à celles du CRAC (YUE *et al.*, 2001), cependant ces résultats demeurent controversés, étant donné qu'un autre groupe a publié des études infirmant cette hypothèse (VOETS *et al.*, 2001).

3.5 Canaux TRP

Malgré les efforts d'identifier la nature moléculaire (protéine, assemblage) du canal CRAC par la génération de lymphocytes T déficients en activité CRAC (FANGER *et al.*, 1995 ; SERAFINI *et al.*, 1995), l'identité du canal demeure inconnue. Cependant, quelques candidats du canal CRAC ont été proposés récemment, dont ceux représentés par la famille des canaux TRP (*Transient Receptor Potential*) (CLAPHAM *et al.*, 2001). Le classement des TRPs est basé sur leur homologie de séquence et comporte trois groupes, soit les TRPC (canoniques; anciennement TRP courts), les TRPV (vanilloïdes; appellation basée sur la désignation originale *Vanilloid Receptor 1*) et les TRPM (anciennement TRP longs; appellation dérivée de la mélastatine) (MONTELL *et al.*, 2002). L'éventail moléculaire des canaux TRP est vaste et comporte beaucoup de similarités fonctionnelles avec le CRAC, cependant la controverse demeure entière (CLAPHAM, 1996 ; CLAPHAM, 2002). Par exemple, le TRP7 humain (TRPC7), a été proposé comme candidat du SOC, notamment par sa sensibilité à des bloqueurs classiques des SOC tel que le La^{3+} , le Gd^{3+} et le SKF 96365 (RICCIO *et al.*, 2002). De plus, la surexpression de certains TRP de mammifères augmente l'activité CCE, tandis que l'expression d'antisens partiels de TRP peut interférer avec le CCE endogène (BIRNBAUMER *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent que les TRPs sont des éléments structuraux des canaux CCE.

3.6 Le second messenger Ca^{2+}

La concentration intracellulaire de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) est d'environ 50-200 nM au repos (KREBS, 1998), comparativement à 1-2 mM dans le milieu extracellulaire (ABBAS *et al.*, 2000 ; BERRIDGE *et al.*, 2000b) et 2-5 mM dans le RE (KREBS, 1998). Chez les cellules eucaryotes, l'ouverture de canaux de la membrane plasmique ou du RE permet la diffusion de Ca^{2+} externe vers le cytosol selon le gradient de concentration (GUERINI, 1998a). Ainsi, lors de l'activation cellulaire, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ atteint un maximum de 500-1000 nM (BERRIDGE *et al.*, 2000b), soit le seuil requis pour activer les protéines sensibles au Ca^{2+} sur lesquelles ce dernier se lie principalement via des résidus aspartate et glutamate (CLAPHAM, 1995). Le Ca^{2+} est donc un second messenger capital qui régule une multitude de processus et ce par la versatilité de la signalisation calcique en terme de vitesse, d'amplitude et de patron spatio-temporel (BERRIDGE *et al.*, 2000b). Notamment, l'expression d'IL-2 et de son récepteur sont modulés à la hausse par le Ca^{2+} et le phorbol ester chez les lymphocytes T humains (CHOPRA *et al.*, 1987). De plus, chez les thymocytes humains, une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ réduit l'expression des chaînes α et β du TCR et augmente l'expression de la chaîne γ (MARTINEZ-VALDEZ *et al.*, 1988). Par contre, chez les cellules T Jurkat, un influx soutenu de Ca^{2+} suite à une stimulation par la thapsigargine induit une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine de la chaîne α de du récepteur de l'IL2, et ce indépendamment de la PKC (SEI et REICH, 1995).

3.7 PMCA et SERCA

Il est important que les augmentations de Ca^{2+} cytosolique soient transitoires car une élévation calcique soutenue peut mener à une surcharge mitochondriale, une activation de protéases, une activation d'enzymes de la fragmentation de l'ADN, et la mort cellulaire (GUERINI, 1998a). Alors, il existe deux protéines dans la membrane plasmique dont la fonction est de réduire la concentration de Ca^{2+} cytosolique, soit l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et la pompe ATPasique de Ca^{2+} , PMCA (*Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase*). Aussi, un autre point de contrôle est exercé par la pompe ATPasique du RE, SERCA (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase*) responsable du remplissage des réserves. L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ couple le transport de Ca^{2+} (sortie) avec le cotransport de Na^+ (entrée) (PHILIPSON et NICOLL, 1992) en utilisant l'énergie chimique du gradient de Na^+ (la concentration de Na^+ est plus élevée à l'extérieur de la cellule qu'à l'intérieur) pour diminuer la concentration du Ca^{2+} cytosolique, alors que les pompes ATPases transportent le Ca^{2+} hors de la cellule, contre le gradient chimique de Ca^{2+} , en utilisant l'énergie de l'ATP (CARAFOLI et STAUFFER, 1994).

Quatre gènes indépendants codent les différentes isoformes de la pompe PMCA humaine. Les isoformes 1 et 4 représentent les fonctions de maintien cellulaire (*housekeeping*), tandis que les isoformes 2 et 3 sont seulement présentes dans les tissus spécialisés (CARAFOLI et STAUFFER, 1994). De plus, le nombre d'isoformes est augmenté par épissage alternatif (STREHLER et ZACHARIAS, 2001), à deux sites indépendants des gènes, dont on a détecté plus de 20 transcrits (CARAFOLI et STAUFFER, 1994 ; GUERINI, 1998b ; STREHLER et ZACHARIAS, 2001). Quant à la pompe SERCA, elle est codée par trois gènes indépendants et plus de 10 isoformes

découlent d'épissages alternatifs (GROVER et KHAN, 1992). Malgré la diversité des SERCA, une de leur caractéristique commune est leur inhibition par la thapsigargine (LYTTON *et al.*, 1991) et l'acide cyclopiazonique (GROVER et KHAN, 1992). L'isoforme prédominante chez les cellules Jurkat est la PMCA 4b qui contient un domaine autoinhibiteur en l'extrémité C-terminale cytoplasmique (LEWIS, 2001). La phosphorylation du domaine C-terminal par la protéine kinase C (PKC) lève l'autoinhibition, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la clairance du Ca^{2+} cytosolique par les phorbol esters observée chez les cellules Jurkat (BALASUBRAMANYAM et GARDNER, 1995). Par contre, une étude contradictoire a démontré que chez les lymphocytes T périphériques, l'activation de la PKC module l'entrée et non l'extrusion de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique (BALASUBRAMANYAM *et al.*, 1993). Cela reflète les différences retrouvées parfois entre une lignée cellulaire versus des cellules périphériques. Aussi, à noter que les cellules T périphériques sont souvent dans un état de repos, comparées aux cellules Jurkat qui possèdent un certain degré d'activation (données empiriques). Effectivement, le nombre de canaux CRAC par cellule passe de 15, chez la cellule T au repos, à 140 chez la cellule activée (FOMINA *et al.*, 2000). Possiblement que le nombre de canaux présents au moment de la stimulation ait un lien avec le comportement de la cellule vis-à-vis une activation de PKC.

4. Protéine kinase C

La découverte de la protéine kinase C (protéine kinase dépendante du Ca^{2+} ; PKC) en 1977 a été une percée majeure dans le domaine de la transduction de signal (TAKAI *et al.*, 1977). La PKC phosphoryle une variété de substrats sur des résidus sérine et

thréonine. La famille des PKC comprend trois sous-types (HUG et SARRE, 1993 ; MELLOR et PARKER, 1998 ; RON et KAZANIETZ, 1999) dont les différents domaines sont illustrés à la Figure 4. Les PKC conventionnelles ou classiques (cPKC) incluent la PKC α , PKC β I, PKC β II et PKC γ . Elles sont modulées par le Ca²⁺ et/ou le DAG, les phorbols esters et les phospholipides. Les PKC nouvelles (nPKC) incluent les isoformes δ , ϵ , η et θ ; elles répondent à des activateurs similaires que ceux des cPKC, sauf le Ca²⁺.

Enfin, il existe deux membres des PKC atypiques (aPKC), soit la PKC ζ et la PKC ι/λ , où l'isoforme λ est l'homologue murin, dont les activateurs spécifiques ne sont pas connus. Chaque isoforme de PKC est le produit d'un gène différent, sauf les PKC β I et β II qui sont des variants d'épissage alternatif. Toutes les isoformes partagent un domaine de pseudosubstrat (où un résidu alanine remplace la sérine dans le motif consensus de phosphorylation) en N-terminal qui régule négativement le domaine catalytique ATP-dépendant présent en C-terminal. Le domaine N-terminal proximal comprend la région C1 qui lie les phospholipides, les acides gras, le DAG et les phorbol esters; l'autre région est C2 et est un site de la liaison au Ca²⁺. La présence ou l'absence des domaines régulateurs est responsable des différences dans la sensibilité des isoformes de la PKC à divers modulateurs. Les PKC sont largement distribuées dans l'organisme (BATTAINI, 2001) et on retrouve les isoformes α , β I, β II, δ , ϵ , θ et ζ chez le lymphocyte T (TSUTSUMI *et al.*, 1993 ; AHNADI *et al.*, 2000).

4.1 Régulation des isoformes de la PKC par les phospholipides

La régulation des PKC par les lipides et divers modulateurs a été bien caractérisée. Les phospholipides sont des effecteurs efficaces d'activation des PKC, avec

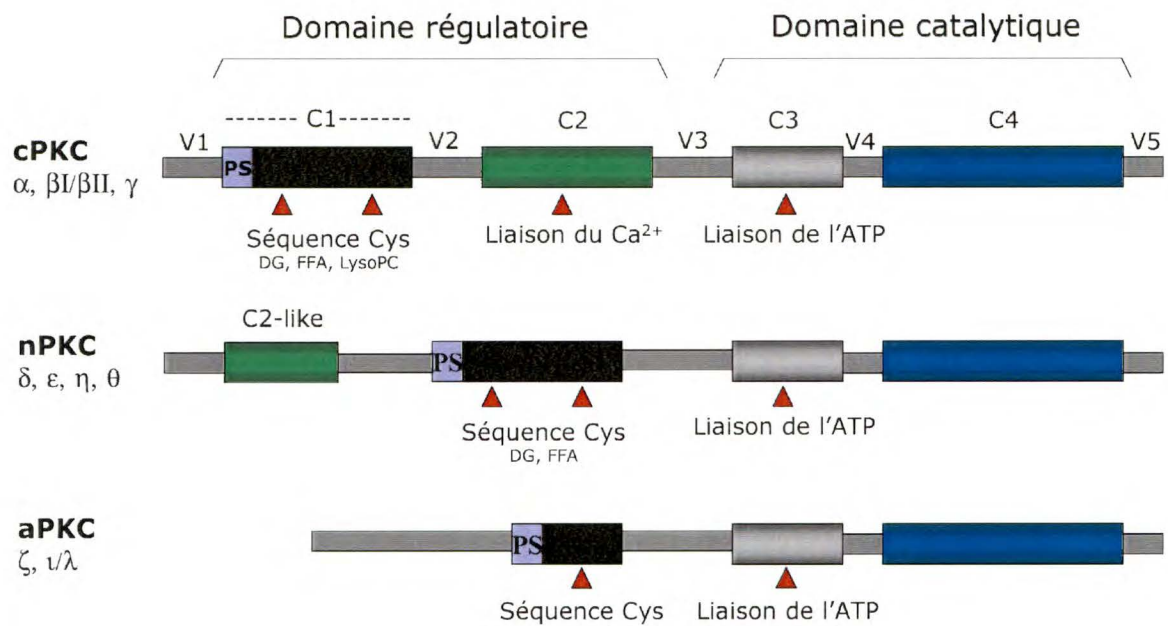


Figure 2. Structure et domaines des PKC

Abréviations : Cys, cystéine ; DG, diacylglycérol ; FFA, acides gras libres (*free fatty acids*) ; LysoPC, lysophosphatidylcholine ; PS, domaine de pseudosubstrat.

(RON et KAZANIETZ, 1999)

une haute sélectivité pour la phosphatidylsérine (PS), où le DAG augmente dramatiquement l'affinité des cPKC et nPKC pour la PS. La PKC est régulée par deux mécanismes séquentiels (DEMPSEY *et al.*, 2000), soit la phosphorylation de PKC par la PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent kinase*) et le contrôle allostérique médié par la liaison du second messenger DAG (Figure 5). Chacun de ces mécanismes régule la structure, la localisation cellulaire et la fonction de PKC.

La PKC non-phosphorylée est associée à la membrane où elle devient phosphorylée sur un résidu thréonine de la boucle d'activation par la PDK1. La conséquence immédiate de cette phosphorylation est l'autophosphorylation de PKC sur ses domaines C1 et C2. L'enzyme phosphorylée est ensuite relâchée dans le cytosol où elle est maintenue dans une conformation inactive par liaison à la séquence autoinhibitrice du pseudosubstrat. Le recrutement à la membrane en réponse au DAG (ou phorbol ester) et à la PS procure l'énergie nécessaire pour un changement conformationnel entraînant la relâche de la région du pseudosubstrat de son site de liaison, ce qui engendre l'activation de PKC (RON et KAZANIETZ, 1999). La région du pseudosubstrat est primordiale dans la régulation de l'activité des PKC. Elle réfère à un motif consensus *XXXX(S/T)XXX* retrouvé dans les sites de phosphorylation des substrats de PKC.

Cependant, dans la région du pseudosubstrat, un résidu alanine remplace la sérine ou la thréonine. Une mutation de ce résidu alanine en glutamate entraîne une forme constitutivement active de l'enzyme, tandis qu'une délétion du pseudosubstrat confère le même phénotype (PEARS *et al.*, 1990). Une fois le pseudosubstrat enlevé, ce dernier peut contribuer à la liaison membranaire via ses résidus basiques. Cette association avec

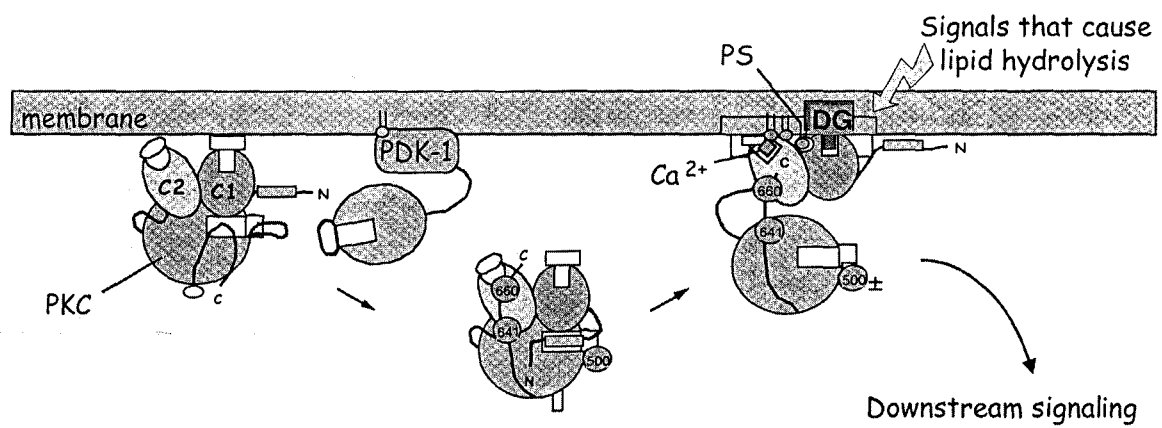


Figure 5. Représentation schématique des deux modes de régulation des PKC
(DEMPSEY *et al.*, 2000)

la membrane est représentée par un déplacement dans la localisation cellulaire ou « translocation » de la PKC cytosolique vers les compartiments membranaires, un processus étroitement contrôlé par des interactions avec des protéines adaptatrices (MOCHLY-ROSEN *et al.*, 1991 ; SCHECHTMAN et MOCHLY-ROSEN, 2001).

4.2 Régulation des isoformes de la PKC par le calcium

La régulation des PKC par le Ca^{2+} n'est pas bien comprise, quoique des travaux suggèrent une interaction allostérique entre le Ca^{2+} et les phospholipides, ce qui augmente l'affinité des cPKC pour ces phospholipides. De plus, la translocation membranaire et l'activation sont régulées différemment par la concentration de Ca^{2+} : des concentrations faibles de Ca^{2+} sont suffisantes pour la liaison à la membrane, tandis que des concentrations élevées sont nécessaires pour un changement conformationnel entraînant la relâche du pseudosubstrat et l'activation des PKC sensibles au Ca^{2+} (BAZZI et NELSESTUEN, 1990).

4.3 Rôles des isoformes de la PKC

Le rôle des PKC dans la cellule est d'un grand impact sur la physiologie cellulaire. Les PKC médient des fonctions cellulaires multiples comme la perméabilité, la contraction, la migration, l'hypertrophie, la prolifération, l'apoptose et la sécrétion (DEMPSEY *et al.*, 2000 ; JAKEN et PARKER, 2000). Par exemple, la PKC θ est spécifiquement exprimée chez les lymphocytes T et est inconditionnelle pour l'activation des cellules T matures par le TCR (ISAKOV et ALTMAN, 2002). Elle est recrutée à la synapse immune (DUSTIN et SHAW, 1999 ; GRAKOUÏ *et al.*, 1999 ; BROMLEY *et al.*, 2001 ; DUSTIN, 2002 ; SIMS et DUSTIN, 2002) et est nécessaire pour l'induction du

gène de l'IL-2 qui est dépendante des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B. Ces derniers sont les cibles principales de la PKC θ (ISAKOV et ALTMAN, 2002 ; VILLALBA et ALTMAN, 2002). Une invalidation des gènes de PKC γ et PKC β chez la souris est associée avec des désordres bénins neurologiques et immunologiques, respectivement. Dans ces cas, les phénotypes bénins ont été attribués à une compensation partielle par les autres isoenzymes de PKC. De fait, la spécificité large et chevauchante des substrats suggère une redondance fonctionnelle des PKC *in vitro* (MELLOR et PARKER, 1998).

4.4 Rôle de la PKC et des protéines phosphatases dans la réponse calcique

Plusieurs travaux appuient l'implication des PKC dans la modulation de la signalisation calcique. Par exemple, l'isoforme PKC β I réduit la phase soutenue de l'influx de Ca²⁺ induit par l'activation du TCR chez les cellules T Jurkat (HAVERSTICK *et al.*, 1997). D'autres études ont montré que l'augmentation de [Ca²⁺]_i médiée par le TCR chez les cellules HPB-ALL (SHIVNAN et ALEXANDER, 1995) et les cellules LBRM-33 de lymphome T murin (ABRAHAM *et al.*, 1988) est inhibée par l'activation de la PKC. Les sérine et thréonine protéine phosphatases (S/T PPases) jouent un rôle dans la régulation de la mobilisation calcique dans plusieurs types cellulaires. Généralement, les S/T PPases opposent l'effet des PKC en déphosphorylant les substrats des PKC. Des inhibiteurs de S/T PPases suppriment l'influx de Ca²⁺ médié par la thrombine chez les plaquettes humaines (KOIKE *et al.*, 1994), particulièrement PP1 (MURATA *et al.*, 1993). Également, la calcineurine (PP2B) a été impliquée dans la régulation négative de l'entrée de Ca²⁺ chez les cellules de neuroblastome NG105-15 exprimant la PP2B β 3 humaine (BURLEY et SIHRA, 2000). L'activité phosphatase est

aussi connue pour sa régulation de l'influx de Ca^{2+} induit par le carbachol chez les cellules acinaires de la glande parotide (SAKAI et AMBUDKAR, 1996).

5. Mort cellulaire

Le concept d'apoptose ou mort cellulaire programmée, a été introduit par Kerr *et al.* (1972). Elle résulte en une élimination ordonnée et efficace des cellules endommagées ou inutiles, telles que celles découlant d'un dommage à l'ADN, ou durant le développement. Plusieurs facteurs contribuent à ce processus dont chacun démontre une spécificité de fonction, de régulation et d'implication de voies. C'est un processus au cours duquel la cellule diminue de volume et se dissocie de son voisinage, ses organelles gardent cependant leur taille, mais la chromatine forme des agrégats denses sur la membrane nucléaire et se fragmente ultérieurement. Par contre, les cellules nécrotiques gonflent, leurs mitochondries s'élargissent, la membrane plasmique se détruit, mais les changements nucléaires sont marginaux (KREBS, 1998) (Tableau 1).

La mort cellulaire peut être envisagée comme étant une continuité possédant deux pôles, l'apoptose (Kerr *et al.*, 1972) et la nécrose (Figure 6). Entre ces deux extrêmes existe une multitude de voies démontrant des degrés variables des caractéristiques apoptotiques ou nécrotiques. À tout point dans ce continuum, différentes voies existent et peuvent être sous-divisées selon divers systèmes de classification, par exemple les voies intrinsèques, extrinsèques, dépendantes ou indépendantes de p53, physiologiques et pathologiques. Dans ce schéma, les voies de mort cellulaire sont illustrées par analogie à un arbre, dont plusieurs voies d'initiation (branches) sont interconnectées mais convergent vers la phase de « commitment » (tronc). Au delà de ce point, il y a différentes voies divergentes d'exécution de la mort cellulaire (racines). Lorsqu'une voie

Apoptose	Nécrose Primaire
Physiologique ou Pathologique (dommage subnécrotique)	Accidentelle Toujours pathologique
Susceptibilité hautement régulée	Non-régulée ou peu régulée
Membranes plasmiques quasi-intactes jusqu'au stade tardif	Membrane plasmique détruite précocement
Élimination hétérophagique	
Sans fuite de contenu cellulaire	Fuite du contenu cellulaire
Peu ou pas d'inflammation	Inflammation
Participation d'enzymes cellulaires, causant des changements morphologiques et biochimiques typiques comme: <ul style="list-style-type: none"> • la condensation de la chromatine (pyknosis) • la fragmentation nucléaire (karyorrhexis) • fragmentation de l'ADN (endonucléolyse) • la dégradation sélective de protéines par des protéases spécifiques • les changements subtils dans les membranes plasmiques (perte de l'asymétrie membranaire avant la perte de son intégrité) • le rétrécissement de la cellule • pas de gonflement mitochondrial 	Changements morphologiques et biochimiques incluent: <ul style="list-style-type: none"> • gonflement entier du cytoplasme (oncoses) • gonflement mitochondrial
	Nécrose Secondaire
	Cytolyse secondaire à l'apoptose lorsque les cellules mourantes ne sont pas éliminées par hétérophagie

Tableau 1. Éléments comparatifs de l'apoptose et de la nécrose

(KROEMER *et al.*, 1998)

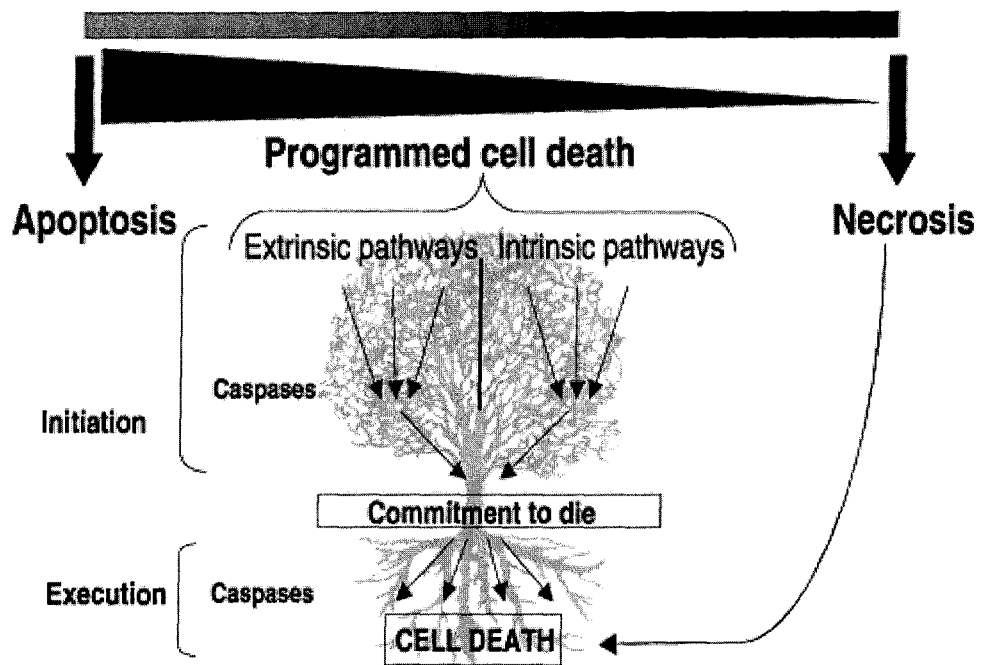


Figure 6. Représentation schématique du continuum entre les diverses cascades de la mort cellulaire

(ASHE et BERRY, 2003)

est dysfonctionnelle (par analogie à une branche malade), elle peut être écartée sans affecter le système (arbre) en entier. Le contrôle de l'apoptose est essentiel à l'homéostasie de l'organisme. Une dérégulation ou une résistance à l'apoptose peut mener aux désordres autoimmuns et aux cancers tandis qu'une accentuation non-contrôlée de l'apoptose peut favoriser des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou des déficiences immunes comme le SIDA (KREBS, 1998).

5.1 Caspases

Les caspases (*Aspartyl-Specific Cysteine Proteases*) sont des protéases à cystéine active qui clivent leurs substrats du côté C-terminal d'un résidu aspartate. Plus de quatorze protéines de la famille des caspases ont été identifiées jusqu'à présent chez les mammifères (SARTORIUS *et al.*, 2001). Le domaine protéasique de l'enzyme est formé par l'association de deux grandes sous-unités (~20 kDa chacune) contenant le site actif, avec deux petites sous-unités (~10 kDa chacune). Cet assemblage a été proposé à partir des structures cristallographiques des caspase-1, caspase-3 et caspase-8 (WALKER *et al.*, 1994 ; SARTORIUS *et al.*, 2001). Les caspases possèdent un spectre étendu de substrats et exercent diverses fonctions dans l'apoptose et l'inflammation (Tableau 2). Notamment, elles participent à l'inactivation d'enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN (PARP, *poly ADP-ribose polymérase*), l'inactivation d'enzymes impliquées dans la réplication cellulaire (ADN topoisomérase II), la dégradation de protéines de la structure nucléaire (lamines) et, indirectement, la fragmentation de l'ADN via l'activation de la CAD/DFF40 (*Caspase activated DNase*).

Caspase	Nom Alternatif	Substrats	Fonctions
1	ICE	Pré-IL-1 β IL-18 Lamines	Maturation des interleukines (inflammation). Peut induire l'apoptose dépendamment de l'isoforme, ou si surexprimée.
2	Ich-1 (humaine) Nedd2 (rat, souris)	Golgine-160 Lamines (?)	Apoptose (activité supprimée par privation de sérum)
3	CPP32 Yama Apopaïne	PARP, SREBs, Gelsoline, Caspase-6, Caspase-7, Caspase-9, DNA-PK, Fodrine, MDM2, β -Caténine, Lamines, NuMA, protéines HnRNP, FAK, Gas2, Topoisomérase I, Calpastatine, p21 ^{Waf1} Présénéline2, ICAD	Apoptose
4	Ich-2 ICErel _{II}	Caspase-1	Inflammation/Apoptose Similaire aux caspases-1 et -5 humaines.
5	ICErel _{III} TY	?	Inflammation/Apoptose Similaire aux caspases-1 et -4 humaines.
6	Mch2	PARP Lamines NuMA FAK Caspase-3 Kératine-18	Apoptose
7	Mch3 ICE-LAP3 CMH-1	PARP Gas2 SREB1 EMAP II FAK Calpastatine p21 ^{Waf1}	Apoptose (activité bloquée par cIAP1 et cIAP2) Similaire en structure et en spécificité de substrat à la caspase-3.

Tableau 2. Sommaire des propriétés des caspases, leurs substrats et leurs fonctions

8	FLICE MACH Mch5	Caspase-3 Caspase-4 Caspase-6 Caspase-7 Caspase-9 Caspase-10 Caspase-13 PARP Bid	Apoptose (récepteurs de mort cellulaire)
9	Apaf-3 ICE-LAP6 Mch6	Caspase-3 pro-Caspase-9 Caspase-7 PARP	Apoptose
10	FLICE-2 Mch4	Caspase-3 Caspase-4 Caspase-6 Caspase-7 Caspase-8 Caspase-9	Apoptose (récepteurs de mort cellulaire)
11	Ich-3, ICE_B	?	Caspase murine similaire à la caspase-4 humaine. Appartient à la même famille que la caspase-3. Peut être impliquée dans l'inflammation et l'apoptose.
12	ICE_C	?	Impliquée dans l'apoptose induite par un stress du RE.
13	ERICE	?	Membre de la famille ICE des caspases, incluant caspase-1, -4, -5 et -11. Impliquée dans l'inflammation.
14	-	?	Faiblement maturée durant l'apoptose. Ne clive pas les substrats classiques des caspases. Participe dans la différenciation terminale de d'épithélium complexe.

Tableau 2 (suite). Sommaire des caspases, leurs substrats et leurs fonctions

(GROUPE R.C.D.R., 2004)

Les caspases initiatrices (pro-caspase-2, -8, -9, 10 et possiblement 12), ainsi que les caspases dites inflammatoires (pro-caspase-1, -4, -5, -11 et -13) (qui ne sont, à quelques exceptions, pas impliquées dans l'apoptose) contiennent de longs pro-domaines de plus de 100 acides aminés, tandis que les pro-domaines chez les caspases exécutrices (pro-caspase-3, -6 et -7) sont courts de moins de 20 acides aminés (EARNSHAW *et al.*, 1999).

5.1.1 Activation des caspases : protéolyse de zymogènes

Les caspases sont synthétisées sous forme de proenzymes (zymogènes) et sont activables selon trois modes (HENGARTNER, 2000). Le premier est par clivage protéolytique du zymogène entre les domaines p10 et p20, et souvent entre le pro-domaine et le domaine p20. En effet, pour activer une pro-caspase, il suffit de l'exposer à une autre caspase préalablement activée, comme c'est le cas des caspases-3, -6 et -7 (HENGARTNER, 2000). Les pro-caspases (32-56 kDa) contiennent quatre domaines (EARNSHAW *et al.*, 1999), un prodomaine N-terminal, une grande sous-unité de 17-21 kDa, une petite sous-unité de 10-13 kDa et une région chaînon (*linker*) entre les grande et petite sous-unités. Tous ces sites de clivage sont situés à des sites Asp-X (sites substrats candidats des caspases) suggérant la possibilité d'activation autocatalytique (THORNBERRY *et al.*, 1997). L'activation des caspases résulte en une dissociation du pro-domaine et de la région chaînon, puis en une formation d'un hétérodimère contenant une grande et une petite sous-unité (LIANG et FESIK, 1997). Ainsi, la caspase active est un tétramère composé de deux de ces hétérodimères, donc de deux sites actifs (Figure 7).

5.1.2 Activation des caspases : induction proximale

La caspase-8 est l'enzyme initiatrice de la voie extrinsèque (voir section 5.2).

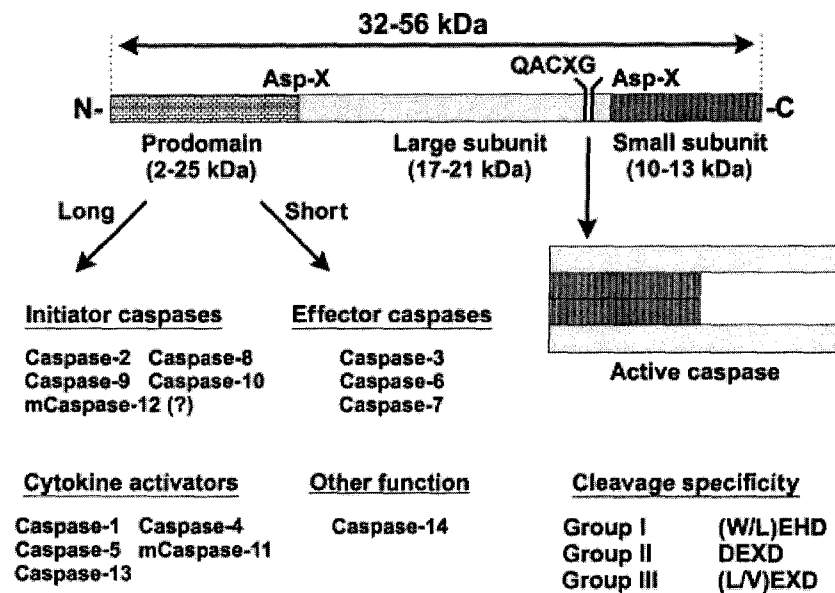


Figure 7. Organisation structurale et fonctionnelle des caspases

(KÖHLER *et al.*, 2002)

Lors de l'activation de récepteurs de mort cellulaire, comme le CD95 (Apo-1/Fas), ces derniers s'agglomèrent et forment des complexes de signalisation. Ces complexes recrutent plusieurs molécules de pro-caspase-8 via des protéines adaptatrices, causant ainsi une concentration locale élevée du zymogène. Le modèle d'induction proximale stipule que dans ces conditions, la faible activité intrinsèque de la pro-caspase-8 (MUZIO *et al.*, 1998) est suffisante pour permettre le clivage mutuel de molécules pro-enzymatiques et leur activation. Un tel mécanisme a été proposé pour l'activation de la caspase-2 et de la caspase CED-3 du nématode (YANG *et al.*, 1998).

5.1.3 Activation des caspases : association avec une sous-unité régulatrice

Contrairement aux autres caspases, le clivage protéolytique de la pro-caspase-9 a un faible effet sur son activité catalytique (RODRIGUEZ et LAZEBNIK, 1999 ; STENNICKE *et al.*, 1999). Toutefois, l'activation de caspase-9 nécessite une association avec deux autres protéines, soit la protéine adaptatrice Apaf-1 et le cytochrome c. Ce dernier, confiné exclusivement dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie, est relâché dans le cytosol suite à l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose (voir section 5.2) où il forme un complexe héptamérique (ACEHAN *et al.*, 2002) (Figure 8) avec Apaf-1 et la procaspase-9 (THORNBERRY et LAZEBNIK, 1998). Ce n'est que dans cette configuration holoenzymatique (RODRIGUEZ et LAZEBNIK, 1999), couramment appelée apoptosome, que le cytochrome c est actif, d'une manière dépendante de l'ATP (LIU *et al.*, 1996), dans un état oxydé (HANCOCK *et al.*, 2001), et non indépendamment de son état redox tel que suggéré auparavant (KLUCK *et al.*, 1997).

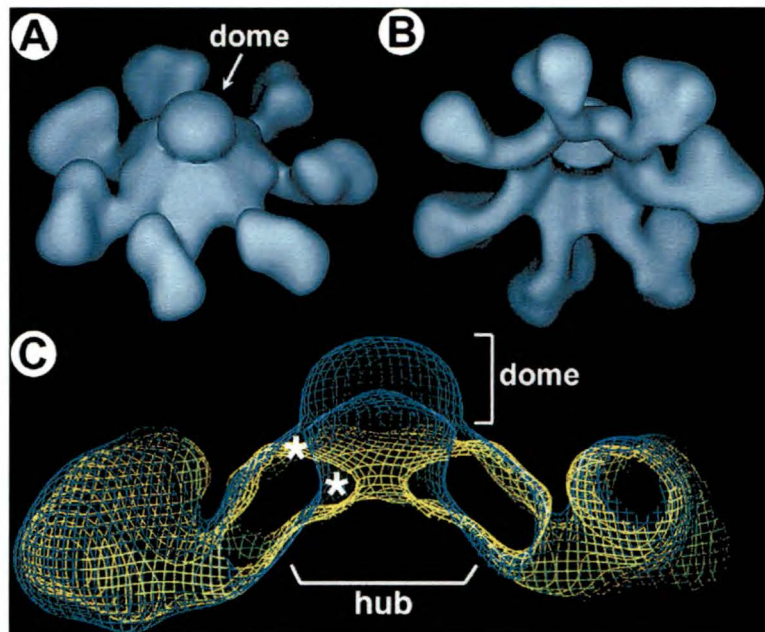


Figure 3. Structure tridimensionnelle de l'apoptosome lié à la procaspase-9.

Structure tridimensionnelle de l'apoptosome déterminée par cryomicroscopie électronique à une résolution de 27Å révélant une particule heptamérique semblable à une roue symétrique.(ACEHAN *et al.*, 2002)

5.1.4 Régulation des caspases par les IAP

Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) sont une famille de protéines caractérisées par une ou plusieurs répétitions de 70-80 aa appelées BIR (*baculoviral inhibitor of apoptosis protein repeat*). Le domaine BIR, riche en cystéines et histidines, est capable de chélater le zinc et de former une structure globulaire consistant en quatre ou cinq hélices α ainsi qu'un nombre variable de feuillets β anti-parallèles (LISTON *et al.*, 2003). Les IAP sont des régulatrices intrinsèques de la cascade des caspases aptes à réguler l'activité des caspases initiateur (caspase-9) et effectrices (caspase-3 et -7). On a montré que les domaines BIR étaient responsables de l'inhibition directe des caspases (TAKAHASHI *et al.*, 1998).

Une autre fonction de certaines IAP (XIAP, c-IAP1 et c-IAP2) est leur capacité d'ubiquitiner la protéine Smac/DIABLO (*second mitochondrial activator of caspases*), un antagoniste de la fonction IAP. Trois protéines peuvent se lier aux IAP et supprimer leur activité, soit XAF1 (*XIAP-associated factor1*), Smac et Omi/HtrA2 (Figure 9). Contrairement à XAF1, Smac réside dans la mitochondrie et est relâché suite à un stress apoptotique. Smac peut lier tous les IAP, incluant XIAP, c-IAP1, c-IAP2, survivine (DU *et al.*, 2000) et livine (VUCIC *et al.*, 2002).

5.2 Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose

L'apoptose peut être induite par plusieurs stimuli ou messagers, soit via des récepteurs membranaires, la perforine et le granzyme B (relâchés par les cellules T cytotoxiques et NK), , les agents chimiothérapeutiques, l'irradiation et les hormones (e.g. glucocorticoïdes). Deux voies peuvent mener ainsi à l'apoptose (Figure 9).

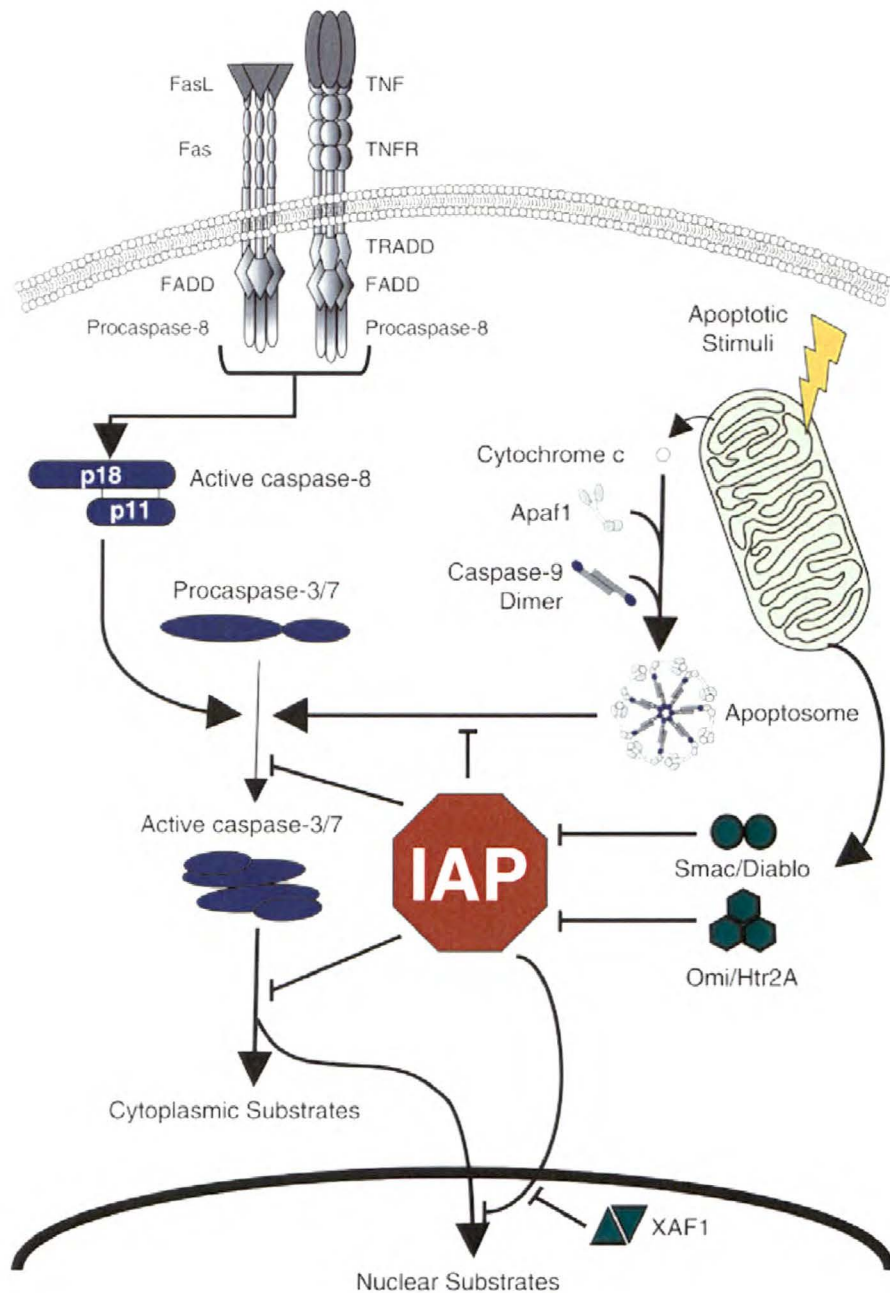


Figure 4. Rôle des IAPs dans la régulation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

(LISTON *et al.*, 2003)

La première est la voie extrinsèque, initiée par l'engagement de récepteurs de surface appartenant à la superfamille du récepteur du TNF (*tumor necrosis factor*). Ce sont des récepteurs membranaires de type I caractérisés par des domaines extracellulaires riches en résidus cystéines (*cysteine-rich domains*; CRD) ainsi que des domaines intracellulaires de mort (*death domains*; DD) (ASHE et BERRY, 2003). Des exemples de ces récepteurs sont le TNF-R1 (CD120a), le CD95 (APO-1 ou Fas), le DR3 (APO-3, LARD, TRAMP, WSL1) et les récepteurs du TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), soient TRAIL-R1 (APO-2, DR4), TRAIL-R2 (DR5, KILLER, TRICK2) et DR6 (ASHKENAZI et DIXIT, 1998 ; SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1998). L'activation de ces récepteurs par leur ligand mène au commencement de la cascade apoptotique via leur domaine DD composé d'environ 80 résidus acides aminés (TARTAGLIA *et al.*, 1993). L'activation induit le recrutement d'autres protéines contenant des domaines DD afin d'accomplir leur fonction de protéines adaptatrices (ASHE et BERRY, 2003) dans l'activation subséquente des caspases.

L'autre voie menant à l'activation des caspases est la voie intrinsèque aussi appelée voie mitochondriale. Cette voie est déclenchée par des signaux intracellulaires de mort cellulaire, comme les agents endommageant l'ADN, les inhibiteurs de protéines kinases ou même par la ligation de récepteurs membranaires (BUDIHARDJO *et al.*, 1999). L'activation de cette voie est initiée par une perte du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) (LY *et al.*, 2003), suivi de l'ouverture d'un pore de transition de perméabilité (PTP), un complexe régulé par plusieurs protéines de la famille Bcl-2 (BUDIHARDJO *et al.*, 1999). L'ouverture du PTP n'engendre pas seulement la perte du $\Delta\Psi_m$, mais permet aussi la relâche rapide du cytochrome c dans le cytoplasme. Des

inhibiteurs pharmacologiques du PTP peuvent agir comme inhibiteurs de la relâche du cytochrome c, empêchant ainsi l'apoptose (LOEFFLER et KROEMER, 2000). À noter que le cytochrome c peut être relâché en l'absence d'une perte de $\Delta\Psi_m$ (LOEFFLER et KROEMER, 2000), suggérant que le PTP ne soit pas la seule cible des protéines de la famille Bcl-2.

L'induction de l'apoptose via la voie extrinsèque résulte en un recrutement et une activation de caspases initiatrices (caspase 2, 8 ou 10) via des protéines adaptatrices, tandis que la voie intrinsèque résulte en l'activation de la caspase 9. L'activation des caspases initiatrices est la première étape d'une voie protéolytique hautement régulée, irréversible et auto-amplifiée (ASHE et BERRY, 2003), qui culmine en l'activation protéolytique de plusieurs caspases exécutrices, conduisant à la fragmentation de l'ADN (SCAFFIDI *et al.*, 1998), un phénomène strictement dépendant de l'activité de la caspase-3 (CRYNS et YUAN, 1998).

5.3 Éléments précoces de l'apoptose

Les cellules exhibent normalement une distribution asymétrique de phospholipides dans la membrane plasmique, où la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE) résident dans le feuillet interne, tandis que la phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont enrichies dans le feuillet externe de la bicouche lipidique (ZACHOWSKI *et al.*, 1986). Les mécanismes de translocation de la PS demeurent inconnus, quoiqu'une enzyme récemment clonée, la scramblase de phospholipides (PLSCR1), soit une candidate pour cette activité de translocation (SIMS et WIEDMER, 2001). Lors d'une activation ou d'un dommage cellulaires, la PS et la PE sont relocalisées dans le feuillet bilipidique externe. Dans le cas d'une mort cellulaire

programmée, les cellules apoptotiques sont rapidement phagocytées par les cellules voisines ou les phagocytes (SCHLEGEL *et al.*, 1996 ; VERHOVEN *et al.*, 1999). Ces derniers reconnaissent des signaux à la surface des cellules mortes, en particulier la PS externalisée (SAVILL et FADOK, 2000). La relocalisation de PS et PE constitue un phénomène précoce du processus apoptotique qui semble dépendre du type cellulaire et de l'activité des caspases (FADEEL *et al.*, 1999). Un autre indice précoce de la mort apoptotique est la formation de protubérances membranaires appelées « blebs » dont la formation dépend de l'activation de la sérine/thréonine kinase ROCK I (*Rho effector protein 1*) par les caspases (COLEMAN *et al.*, 2001), en particulier la caspase-3 (SEBBAGH *et al.*, 2001). Il est à noter que la durée de l'apoptose est estimée entre 12 et 24 h, cependant chez des cellules maintenues en culture, les changements morphologiques sont apparents en moins de 2 h (SARASTE, 1999).

5.4 Éléments tardifs de l'apoptose

La finalité de l'apoptose est la dégradation contrôlée de plusieurs composantes intracellulaires. La caspase-3 joue un rôle majeur dans l'exécution de l'apoptose. Elle est activée dans la plupart des processus apoptotiques et est la caspase exécutrice principale. Son activation est essentielle pour divers événements précoces de l'apoptose, mais aussi pour les événements tardifs. Ultimement, toutes les voies apoptotiques, extrinsèque ou intrinsèque, convergent vers l'activation de la caspase-3. L'enzyme CAD/DFF-40 normalement retenue dans le cytoplasme par la chaperone ICAD/DFF-45, est relâchée et migre au noyau suite à la dégradation de ICAD par la caspase-3 (WOLF *et al.*, 1999 ; NAGATA, 2000 ; BIDÈRE et SENIK, 2001). La conséquence est que l'ADN est fragmenté par la CAD, ce qui constitue l'événement marquant de l'apoptose (CRYNS et

YUAN, 1998). La condensation de la chromatine est aussi un événement tardif de l'apoptose régit par la protéine acinus, d'une façon dépendante de la caspase-3 (SAHARA *et al.*, 1999).

6. Récepteurs purinergiques

Les concentrations extracellulaires des nucléotides sont généralement faibles sous conditions normales. Toutefois, des cellules immunes activées (lymphocytes, macrophages, microglies et plaquettes) ainsi que des cellules endommagées (LEFEUVRE *et al.*, 2002a) peuvent relâcher des concentrations élevées de différents nucléotides bisphosphatés et trisphosphatés dans le milieu extracellulaire (DUBYAK et EL-MOATASSIM, 1993). L'ATP est relâché dans l'environnement extracellulaire par des mécanismes non-lytiques, comme à la suite d'un traumatisme, en réponse à des conditions inflammatoires ou suite à un dommage tissulaire (e.g., ischémie/hypoxie) (NIEBER *et al.*, 1999). De plus, les phénomènes mécaniques d'étirement membranaire (*membrane stretch*) sont aussi une source de libération non-lytique d'ATP extracellulaire, notamment chez les astrocytes et les neurones (AHMED *et al.*, 2000), ainsi que chez les cellules uroépithéliales (SUN *et al.*, 2001).

L'action des nucléotides (ATP, ADP, UTP, ADP-glucose) est médiée par une grande famille de récepteurs, particulièrement les récepteurs purinergiques de type P2. Les récepteurs P2 sont divisés en deux sous-groupes (topologie illustrée à la Figure 10), soit des récepteurs P2Y du type RCPG (récepteurs couplés aux protéines G) et des canaux ioniques P2X activés par des ligands (*ligand-gated*). Leur classification actuelle est basée sur la structure moléculaire, contrairement à l'ancienne nomenclature basée sur des critères pharmacologiques et fonctionnels (DI VIRGILIO *et al.*, 2001). Chez les

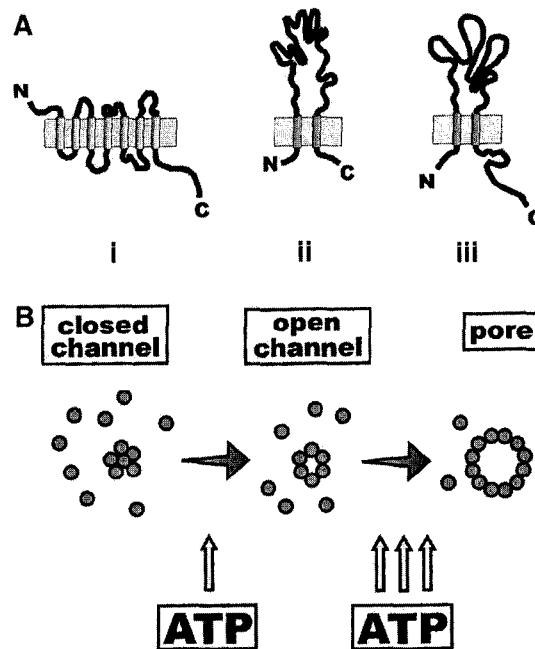


Figure 10. Schématisation de la topologie membranaire des sous-unités des récepteurs P2X et P2Y

A) Les récepteurs P2Y (i) sont typiquement des RCPG à sept domaines transmembranaires composés d'une seule chaîne polypeptidique ayant les extrémités N- et C-terminale orientées vers l'extérieur et l'intérieur de la membrane plasmique, respectivement. Les récepteurs P2X (ii) sont formés par des sous-unités à deux domaines transmembranaires, dont les extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques. La sous-unité P2X₇ diffère des autres membres de la famille P2X (P2X₁₋₆) par sa queue cytoplasmique plus longue (iii). B) Le récepteur P2X₇ fonctionnel est probablement généré par l'aggrégation d'un nombre encore indéterminé de plusieurs sous-unités (possiblement six) pour former un canal activable par l'ATP. Le recrutement additionnel de sous-unités engendre la formation d'un pore non-sélectif, quoiqu'il s'agisse jusqu'à présent d'une hypothèse sans validation expérimentale. (DI VIRGILIO *et al.*, 2001)

mammifères, cinq récepteurs P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁,) et sept récepteurs P2X (P2X₁₋₇) ont été clonés et caractérisés pharmacologiquement, tandis que les récepteurs P2Y₅, P2Y₇, P2Y₉ et P2Y₁₀ ont été exclus de la famille, étant donné qu'ils ne sont pas principalement des récepteurs de nucléotides (DI VIRGILIO *et al.*, 2001). Bien que sept récepteurs P2X soient connus et caractérisés (RALEVIC et BURNSTOCK, 1998), deux travaux récents ont indiqué l'existence d'un récepteur P2X₈ chez le poulet (BO *et al.*, 2000) et chez le crapaud (JENSIK *et al.*, 2001). Ce dernier possède 74% d'homologie avec le récepteur P2X₈ du poulet, et 65% avec le récepteur P2X₅ du rat (JENSIK *et al.*, 2001). La présence d'un huitième récepteur P2X n'est pas encore rapportée chez l'humain.

6.1 Récepteurs P2X

Les récepteurs P2X, dont les premiers ADNc ont été isolés en 1994 (RALEVIC et BURNSTOCK, 1998), sont des canaux ioniques membranaires qui s'ouvrent lors d'une liaison à l'ATP extracellulaire. Chez les vertébrés, les protéines encodées par les gènes de cette famille de récepteurs possèdent 40-50% d'homologie de séquence. Les récepteurs P2X forment des multimères, dont chaque unité possède deux domaines transmembranaires séparés par une boucle extracellulaire d'environ 280 aa. Ces récepteurs peuvent former des structures homomultimériques (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅ et P2X₇) ou hétéromultimériques (TORRES *et al.*, 1999a ; KHAKH *et al.*, 2001), tel que le P2X_{2/3} (RADFORD *et al.*, 1997), le P2X_{1/5} (TORRES *et al.*, 1998), le P2X_{4/6} (LE *et al.*, 1998) et le P2X_{2/6} (TORRES *et al.*, 1999a). La formation de complexes hétéro-oligomérique a lieu chez tous les récepteurs P2X, à l'exception du P2X₇ (TORRES *et al.*, 1999a), via le deuxième domaine transmembranaire (RASSENDREN *et al.*, 1997 ;

TORRES *et al.*, 1999b ; JIANG *et al.*, 2003). Cependant, à noter que jusqu'à présent, ces complexes ont été mis en évidence par des expériences de co-immunoprécipitation chez des cellules transfectées. Enfin, étant donné qu'il existe des variants d'épissage alternatif des gènes de P2X₁, P2X₂, P2X₄ et P2X₆, un nombre plus grand d'hétéro-oligomères pourrait exister dans les tissus natifs (ROBERTSON *et al.*, 2001).

La distribution des récepteurs P2X dans l'organisme est abondante, notamment dans les neurones, la glie, l'épithélium, l'endothélium, les os, les muscles ainsi que les tissus hématopoïétiques. Cela leur confère des fonctions variées, comme la douleur (P2X₂, P2X₃) (CHIZH et ILLES, 2001 ; NORTH, 2003), l'activation des plaquettes (P2X₁) (MAHAUT-SMITH *et al.*, 2004), la transmission synaptique (DEUCHARS *et al.*, 2001 ; PAPP *et al.*, 2004) et la contraction du musculaire (BURNSTOCK, 2000). Tous les récepteurs P2X contiennent une séquence consensus de *N*-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) qui s'avère importante pour le transport de certains récepteurs P2X (P2X₁ et P2X₂) vers la membrane plasmique ainsi que leur fonction dans la conduction du courant ionique (NORTH, 2002).

6.2 Récepteur P2X₇

Le récepteur P2X₇ (P2X₇R) initialement mis en évidence dans les cellules immunitaires (HOGQUIST *et al.*, 1991) a été proposé comme médiateur de l'inflammation et comme élément potentiel dans la neurodégénérescence (DI VIRGILIO, 1995). Le P2X₇R, anciennement connu sous le nom de récepteur P2Z cytolitique (SURPRENANT *et al.*, 1996), se distingue principalement des autres récepteurs P2X par quatre propriétés (NORTH, 2002). Premièrement, la concentration d'ATP requise pour l'activer est supérieure à 100 μ M. Deuxièmement, l'agoniste pharmacologique BzATP

(2'-3'-O-(4-Benzoylbenzoyl)-ATP) est 10-30 fois plus puissant que l'ATP. Troisièmement, l'effet d'agonistes est accentué par une réduction des concentrations extracellulaires d'ions divalents comme le Ca^{2+} et le Mg^{2+} (SURPRENANT *et al.*, 1996), étant donné que l'ATP agit comme agoniste dans sa forme libre (ATP^{4-}) non-liée à des ions divalents (COCKCROFT et GOMPERTS, 1979) ; il en est ainsi pour les autres agonistes du $\text{P2X}_7\text{R}$, soit $\text{BzATP}^{4-} > \text{ATP}^{4-} > \text{MgATP}^{2-} > \text{ADP}^{3-}$ (énoncés selon leur affinité) (ROSS *et al.*, 1997). Et, quatrièmement, l'application répétée d'un agoniste montre des changements marquants dans l'amplitude et le comportement temporel des courants ioniques liés à l'activité $\text{P2X}_7\text{R}$. L'autre particularité du $\text{P2X}_7\text{R}$ est sa prédominance chez les cellules du système immunitaire. Le $\text{P2X}_7\text{R}$ est présent chez les mastocytes (TATHAM et LINDAU, 1990), les macrophages (CHIOZZI *et al.*, 1997 ; FAIRBAIRN *et al.*, 2001 ; ESCHKE *et al.*, 2002), les lymphocytes T (CHUSED *et al.*, 1996) et B (KLAPPERSTÜCK *et al.*, 2000), les monocytes (GU *et al.*, 2000), les ostéoclastes (NAEMSCH *et al.*, 2001), la microglie et les cellules de la moëlle osseuse (COLLO *et al.*, 1997).

Bien que les récepteurs P2X_{1-6} jouent des rôles importants dans la transmission synaptique au niveau du système nerveux, l'expression du $\text{P2X}_7\text{R}$ n'a pas été détectée chez les neurones du cerveau adulte. Par contre, des études récentes ont montré sa présence dans les terminaisons nerveuses pré-synaptiques, suggérant effectivement un rôle dans la transmission synaptique (DEUCHARS *et al.*, 2001). Ces résultats sont en accord avec le clonage du $\text{P2X}_7\text{R}$ à partir du cerveau de rat (SURPRENANT *et al.*, 1996) et ajoutent au spectre d'action du $\text{P2X}_7\text{R}$ dans l'organisme en plus de implication dans les fonctions du système immunitaire. L'implication des $\text{P2X}_7\text{R}$ dans les conditions

neurodégénératives demeure spéculative, étant donné le manque d'études détaillées *in vivo* (LE FEUVRE *et al.*, 2002a).

6.2.1 Pore cytolitique formé par le P2X₇R

L'exposition du P2X₇R à des concentrations élevées d'ATP (son principal ligand endogène) déclenche une activité massive de flux ioniques transmembranaires, en particulier le Ca²⁺ et le Na⁺, ainsi qu'un efflux de K⁺ (LE FEUVRE *et al.*, 2002a). De plus, le P2X₇R humain possède 595 acides aminés et diverge des autres récepteurs P2X par sa longue queue cytoplasmique (~240 acides aminés) responsable de la formation d'un pore cytolitique permettant le passage de solutés allant jusqu'à 900 Da. Dans son état de perméabilité (pore), le P2X₇R est sélectif pour certains ions ; il permet l'entrée du cation éthidium⁺ (314 Da) ou du YO-PRO²⁺ (375 Da) mais exclut le passage du cation propidium²⁺ (414 Da) (VIRGINIO *et al.*, 1999 ; GU *et al.*, 2000). Une délétion de 177 acides aminés en l'extrémité C-terminale du récepteur humain (donnant un récepteur P2X₇-(1-418)) abolit la formation de pore sans affecter les propriétés du canal ionique (SURPRENANT *et al.*, 1996 ; KLAPPERSTÜCK *et al.*, 2001). De plus, l'importance de la queue cytoplasmique dans la formation du pore a été également mise en évidence chez le P2X₇R de rat : une délétion de 14 acides aminés de l'extrémité C-terminale abolit l'entrée d'éthidium (SMART *et al.*, 2003). Même, une mutation naturelle P451L dans le domaine cytoplasmique du P2X₇R murin réduit drastiquement la formation du pore (ADRIOUCH *et al.*, 2002). Cette mutation est équivalente au polymorphisme E496A retrouvé chez le P2X₇R humain qui affecte la formation du pore cytolitique, mais pas du pore ionique (GU *et al.*, 2001 ; WILEY *et al.*, 2002).

6.2.2 Effets cytotoxiques associés avec l'activation du P2X₇R

L'activation du P2X₇R est associée avec une cytotoxicité. D'ailleurs, le P2X₇R est généralement reconnu comme étant un récepteur de mort cellulaire cytolytique, grâce à la formation du pore de perméabilité (DI VIRGILIO *et al.*, 1998). Au fait, il suffit de quelques brèves stimulations du récepteur pour mettre en marche un processus irréversible de mort cellulaire (HOGQUIST *et al.*, 1991 ; LALIBERTÉ *et al.*, 1994). Il a été rapporté que l'inhibiteur pan-caspasique zVAD.fmk diminue de façon significative la mort cellulaire des macrophages exposés à l'ATP et au lipopolysaccharide. De plus, l'ATP n'exerce plus son effet cytotoxique chez des macrophages activés par le lipopolysaccharide chez des souris invalidées pour le gène de la caspase-1 (LE FEUVRE *et al.*, 2002b). Cependant, la caspase-1 ne semble pas être la seule caspase impliquée, car l'engagement du P2X₇R par l'ATP mène à l'activation d'autres caspases, notamment les caspases-1, -3 et -8 (FERRARI *et al.*, 1999). Par conséquent, cela indique une fonction apoptotique du P2X₇R.

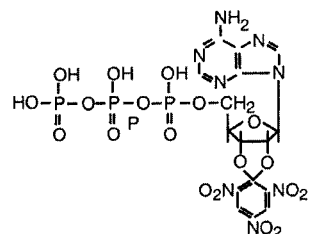
6.2.3 Antagonistes et bloqueurs du P2X₇R

Certains cations sont des bloqueurs des récepteurs P2X₇. Par exemple, les ions zinc, cuivre et les protons bloquent les courants dépendants du P2X₇R de rat (VIRGINIO *et al.*, 1997). De plus, des antagonistes génériques comme la suramine et le PPADS (Figure 11) ont peu d'effet sur les courants ioniques du P2X₇R, cependant le P2X₇R de l'humain est plus sensible au PPADS que le P2X₇R du rat (IC₅₀ ~3 µM, 3 min. d'incubation; sans Mg²⁺, avec 0.5 mM Ca²⁺) (MICHEL *et al.*, 2000). Le Brilliant Blue G (BBG) semble être le plus sélectif dans son blocage des P2X₇R de rat (10 nM) et de

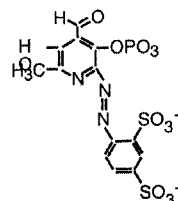
l'humain (200 nM) (JIANG *et al.*, 2000). L'ATP oxydé (ATP dont les groupements hydroxyl en 2' et 3' sont oxydés en aldéhydes par un traitement au périodate) est un antagoniste irréversible et bloque les courants dus au P2X₇R suite à des pré-incubations de 1-2 h (SURPRENANT *et al.*, 1996).

Le troisième type de bloqueurs englobe le cation organique calmidazolium et le dérivé pipérazine KN-62 (Figure 11). Ce dernier est un bloqueur de la CaM kinase II (*calcium/calmodulin-dependant protein kinase II*) et peut inhiber le P2X₇R humain mais pas celui du rat (HUMPHREYS *et al.*, 1998). Toutefois, ces actions ne sont pas reliées ni à l'activité de la calmoduline ni à celle de la CaM kinase II.

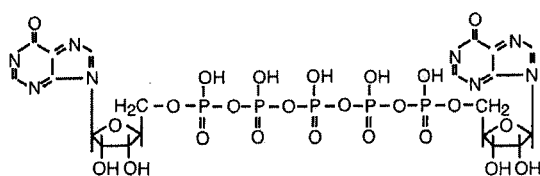
Malgré la sélectivité relative des bloqueurs du P2X₇R, l'interprétation des résultats doit être faite avec prudence. Il y a plusieurs différences entre les espèces (humain, rat, souris) concernant la sensibilité du P2X₇R pour ses agonistes (CHESSELL *et al.*, 1998), des différentes cinétiques de désactivation (HIBELL *et al.*, 2001a), ainsi qu'une influence des conditions expérimentales (température et composition des milieux) sur l'action des antagonistes sur le récepteur (HIBELL *et al.*, 2001b).



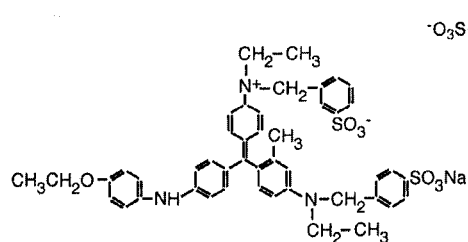
2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP



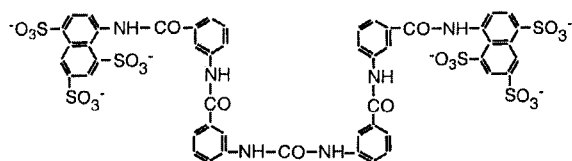
Pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid



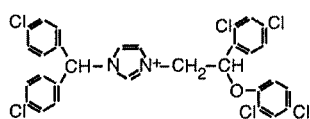
P1,P5-bis(5'-inosyl)pentaphosphate



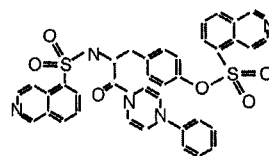
Brilliant Blue G (Sigma)



Suramin



Calmidazolium



KN-62: 1-(N,O-bis-[5-Isoquinolinesulfonyl]-N-methyl-L-tyrosyl)-4-phenylpiperazine

Figure 11. Structures de divers antagonistes des récepteurs purinergiques P2X

(NORTH, 2002)

7. Objectifs du projet

La 4-AP induit des effets autres que ceux de bloquer les canaux K^+ (sections 2.1 et 2.2), tels que l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T. Les objectifs de nos travaux étaient de caractériser certains de ces effets, notamment :

1. Étudier les mécanismes de régulation de la réponse calcique induite par la 4-AP.
2. Définir le mécanisme de la mort cellulaire induite par la 4-AP.
3. Caractériser la formation d'un pore membranaire induit par la 4-AP en comparant les résultats aux propriétés du $P2X_7R$.

Manuscrit I

Barbar, É., Rola-Pleszczynski, M., Payet, M. D. et Dupuis, G. (2003) Protein kinase C inhibits the transplasma membrane influx of Ca^{2+} triggered by 4-aminopyridine in Jurkat T lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1622: 89-98.

Préambule

Ce manuscrit décrit la régulation de l'influx calcique induit par la 4-AP chez le lymphocyte T Jurkat. Nous présentons des résultats qui montrent que la 4-AP induit un influx calcique indépendant de la vidange des réserves et que l'activation de la PKC ou l'inhibition d'une S/T PPase, la PP1, inhibent l'influx calcique dépendant de la 4-AP, soit d'une manière individuelle, soit d'une manière additive. J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans ce manuscrit.

1. Introduction

T cell activation requires two coordinated signals provided by activated antigen-presenting cells [1-3]. One signal is provided by TCR recognition of major histocompatibility complex-restricted antigen and the other signal is initiated by binding of the CD80/CD86 proteins to CD28 on T cells [4-6]. Ligation of the TCR and CD28 receptors initiates a cascade of biochemical events that trigger the up-regulation of protein and lipid kinase activity, the involvement of adaptor proteins, a rearrangement of the cytoskeletal network and the activation of plasma membrane ionic channels [7-9]. This series of complex events lead to gene activation and cell proliferation and differentiation [10]. Two of the earliest events associated with T cell activation are the up-regulation of protein tyrosine kinase activity and the mobilization of Ca^{2+} [11-13]. Ca^{2+} mobilization is initiated by the binding of InsP_3 to its cognate receptor [14], the release of Ca^{2+} from cellular stores and a capacitative [15], sustained transplasma membrane influx of Ca^{2+} through Ca^{2+} channels [16]. The inhibition of protein tyrosine kinases [17] or the blocking of Ca^{2+} influx prevents T cell activation [12].

The occupation of T cell receptors other than the TCR and CD28 may contribute to T cell activation as well. For instance, activation of purinoreceptors by ATP induces Ca^{2+} mobilization in human [18] and murine lymphocytes [19-21] and has a synergistic effect on the TCR/CD3-dependent proliferation of peripheral blood lymphocytes [20]. Purinoreceptors comprise two families of proteins gated by extracellular ATP [22]. Members of the P2Y family are G protein-coupled heptahelical receptors whereas the eight members of the P2X family are cation-permeant channels [23]. P2X₁₋₆ receptors are expressed in a wide variety of tissues whereas P2X₇R is mostly expressed in immune and epithelial cells [24, 25]. Mice lacking P2X₇R are deficient in IL-1 β production and the initiation of the cytokine cascade [26]. P2X₇R possesses physical features that set it apart from its congeners [reviewed in [23]]. Its C-terminal cytoplasmic tail is longer than the other members of the family by 100-200 amino acid residues [27], it contains motifs for protein-protein and protein-lipid interactions [28] and is involved in the gating and signaling properties of the receptor [29]. P2X₇R does not heteropolymerize with other P2X receptors in transfected cells [30] but can assemble as a multi-protein signaling complex when expressed in HEK 293 cells [29]. P2X₇R possesses a low affinity for ATP ($\text{EC}_{50} \sim 500 \mu\text{M}$) but a 10-times higher affinity for the dibenzoylated analog (BzATP) of ATP [27]. Beside the induction of Ca^{2+} mobilization, a brief stimulation of P2X₇R leads to the progressive dilation of a pore from a diameter of 0.8 nm permeable to cations, to a pore of 3-5 nm that allows permeation of ions up to 800 daltons [31]. This property of pore formation has also been reported for the amphibian P2X₈ receptor [32] but not the avian receptor [33]. It is not firmly established whether pore formation is solely due to the P2X₇ protein or whether it involves the participation of an unidentified intrinsic membrane protein(s) that functions as a permeation pathway for large cations [34-36]. Prolonged activation of P2X₇R results in extensive membrane blebbing in host cells expressing P2X₇R that can be followed by cell death [31, 37], as a result of the membrane protein EMP2 association with the C-terminal region of the P2X₇ protein [38].

A number of marine toxins possess the properties to interfere with the activity of plasma membrane channels involved in the movement of ions [39]. This is the case of the marine toxin maitotoxin, a structurally complex polyketide isolated from the

dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* that is one of the most potent toxins known to humans [39]. Maitotoxin activates nonselective cation channels in excitable and non-excitable cells [[36] and ref. therein]. Several studies have shown that maitotoxin triggers an influx of Ca^{2+} in non-excitable cells whereas prolonged exposure to the toxin cause osmotic cell lysis in excitable cells [[36] and ref. therein]. Recent studies have shown that maitotoxin induces a time- and concentration-dependent formation of a cytolytic pore in human skin fibroblasts that shares properties with $\text{P2X}_7\text{R}$ -activated pore [35, 36]. For instance, the maitotoxin-activated pore displays size-restricted properties that enables permeation of the ethidium cation (314 Daltons) but not the POPO-3 (715 Daltons) dye. It was concluded that maitotoxin and $\text{P2X}_7\text{R}$ activated a common cytolytic pore.

T cell activation can be inhibited by a number of pharmacological agents. Among these, blockers of voltage-dependent K^+ channels such as quinine, 4-AP and TEA inhibit cytokine production, T lymphocyte activation and proliferation [40-42] and the activity of natural killer T cells [43]. Several effects of 4-AP on T cell responses have been reported. Guse et al. [44] have shown that 4-AP induced an InsP_3 -independent increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Jurkat cells. We have recently reported that 4-AP triggered a non-capacitative protein kinase- and protein phosphatase-modulated transplasma membrane influx of Ca^{2+} in Jurkat cells that was not related to the blocking effect of 4-AP on K^+ channels [45]. Here, we report additional effects of 4-AP in Jurkat T cells. We showed that 4-AP induced the formation of plasma membrane blebs and the opening of a cationic dye-permeation pore of restricted size that allowed the entry of the ethidium cation but not the larger propidium cation, in a manner reminiscent of the $\text{P2X}_7\text{R}$ -activated pore. Transfection of the cDNA encoding the rat $\text{P2X}_7\text{R}$ in a variety of host cells revealed similarities and differences in the responses to the $\text{P2X}_7\text{R}$ agonist BzATP and to 4-AP, depending on the cell hosts. Our data are consistent with the interpretation that 4-AP triggers the activation of a cation-permeable pore in Jurkat lymphocytes which shares properties with the cytolytic pore resulting from the action of maitotoxin and the activation of $\text{P2X}_7\text{R}$.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents

4-AP, BzATP, ethidium bromide, KN-62 and propidium iodide were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). Fura-2/AM was purchased from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR). FuGENE6 transfection reagent was obtained from Roche Applied Science (Laval, QC). Other chemicals were from Sigma-Aldrich or from local suppliers.

2.2 Cell cultures

Jurkat E6.1 cells were kindly provided by Dr. A. Weiss (Howard Hughes Institute, University of California, San Francisco, CA) and cultured as described [46]. The human monocytic leukemia cells (THP-1), the chinese hamster ovary cells (CHO-K1), the african green monkey kidney cells (COS-7) and the human embryonic kidney cells (HEK 293) were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and cultured as recommended by the supplier.

2.3 Transient cell transfections

The cDNA corresponding to the rat P2X₇ receptor was kindly provided by Dr. A. Surprenant (Institute of Molecular Physiology, University of Sheffield, Sheffield, UK). CHO-K1 cells were transfected by electroporation. CHO-K1 cells were detached from culture dishes by treatment with EDTA in PBS and washed (PBS). The cells (4×10^6) were suspended in an electroporation buffer (400 μ l) containing (mM), HEPES 20, NaCl 137, KCl 5, Na₂HPO₄ 0.7, D-glucose 6 (pH 7.05). The plasmid (20 μ g) of interest was mixed with the cell suspension and incubated for 10 min at room temperature. The mixture was transferred to a 4 mm-gap electroporation cuvette (BTX, San Diego, CA) and electroporated (960 μ F, 230 volts) using a Bio-Rad Gene Pulser instrument (Bio-Rad, Richmond, CA). After 10 min at room temperature, the electroporated cells were plated in 35 or 100 mm Petri dishes containing a DMEM/F12 medium supplemented with 10 % FBS, without antibiotics. Transfection of COS-7 cells was done using DEAE-dextran as described [47], whereas HEK 293 cells were transfected using the FuGENE6 transfection reagent, following the supplier's instructions.

2.4 Amplification of the P2X₇ receptor by RT-PCR

RNA was isolated from Jurkat and THP-1 cells using the RNeasy kit (Qiagen, Mississauga, ON). RNA (2.5 μ g) was reverse transcribed using the Superscript II system (Life Technologies, Burlington, ON). RNA and oligo(dT) primer (0.5 μ g) were mixed (final volume, 12 μ l of water), heated at 70°C for 10 min and then cooled on ice for 15 min. The reaction of reverse transcription was performed in a final volume of 20 μ l for 1 h at 42°C and stopped by heating at 70°C for 15 min. The P2X₇ primers were designed from the P2X₇ human cDNA sequence. Primers for the total (1,779 bp product) amplification of the P2X₇ receptor (GenBank #Y09561) were (sense, 5'-ATGCCGGCCTGCTGCAGCTGCAGTGATGTTTTC-3' and antisense, 5'-TCAGTAAGGACTCTTGAAGCCACTGTACTGCCCT-3'). Primers for the 500 bp product were 5'-ATGCCGGCCTGCTGCAGCTGCAGTGATGTTTTC-3' (sense) and 5'-CTGCCTCGATGGGGCACCAGGCAGAGACTTCAC-3' (antisense). The PCR reaction included 1 μ l of the reverse transcription product, 1.0 μ M of each primer, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.4 mM dNTPs, 0.5 U Taq polymerase (Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC) in a final volume of 50 μ l. The PCR protocol was as follows, 45 s at 94°C, 45 s at 59°C and 1 min at 72 °C for 35 cycles, including an initial 5 min at 94°C and a final 8 min extension at 72°C. Amplification products were analysed on 1.5 % agarose gels.

2.5 Assessment of ethidium and propidium uptake

Two experimental approaches were used. In one series of experiments, Jurkat cells (1×10^6 lymphocytes/ml) were suspended in HEPES (10 mM)-buffered (pH 7.4) KCl (150 mM) containing ethidium bromide (30 μ M) or propidium iodide (30 μ M) and the uptake of the dyes was quantitated as described [48] using a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON). The results were analyzed using the CellQuest software. In the other series of experiments, Jurkat cells were placed in Petri dishes

containing (1 ml, 37°C) a HEPES-BSS buffer (HEPES-buffered saline solution made of (mM) NaCl 140, KCl 5, MgSO₄ 0.5, CaCl₂ 1, Na₂HPO₄ 1, HEPES 10 and *D*-glucose 5.5, pH 7.3). The dish was mounted on the stage of an inverted microscope (Nikon Eclipse 300) and observations made with a 40X or a 100X objective. Pictures were taken every 10 s during various periods of time using a CoolSNAP *f_x* CCD camera (Roper Scientific, Trenton, NJ) under the control of the MetaFluor Imaging System (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA). Images analysis were done using the MetaFluor software. Ethidium bromide (30 µM) was added to the Petri dish 5 min before the beginning of the experiment. Background was set by taking pictures every 10 s for a time period of at least 2 min before the addition of 4-AP. Wavelengths for excitation and emission were 510-560 nm, and 590 nm, respectively.

3. Results

3.1 *4-AP causes plasma membrane blebbing and cell fusion in Jurkat cells*

We [45] and others [44] have reported that 4-AP triggers an internal store-independent robust influx of Ca²⁺ in Jurkat T cells. During the course of our studies on Ca²⁺ mobilization in individual cells, we observed the formation of plasma membrane blebs. We now report that 4-AP triggered a time-dependent formation of blebs in Jurkat lymphocytes in a medium containing Ca²⁺ (1 mM). Resting cells did not show the appearance of blebs (Fig. 1A).

Figure 1

However, exposing the cells to 4-AP (4 mM) induced the appearance of blebs that were clearly observed 120 s after the addition of 4-AP (Fig. 1B) and maximal effects were observed 150 s later (data not shown). It was also observed that 4-AP triggered a time-dependent fusion of some juxtaposed Jurkat cells and polykation formation, in a time-dependent fashion (Fig. 1C).

3.2 *Jurkat cells constitutively express the P2X₇ receptor*

Cell behavior similar to results mentioned above has been reported in the case of activation of the P2X₇ purinergic receptor. For instance, the P2X₇R acts as a cation channel but it also displays the ability to form a permeation pore for large cations and to induce plasma membrane blebbing and fusion that generate multinucleated giant cells in murine macrophages expressing high levels of P2X₇R [49]. These properties led us to a series of experiments to determine whether P2X₇R could be a target of 4-AP. As a first step, we investigated whether the Jurkat cell E6.1 variant used in the present study expressed P2X₇R. RT-PCR analysis clearly indicated that the Jurkat cell variant used here expressed P2X₇R. Results showed (Fig. 2) that the

Figure 2

Jurkat cell variant used here expressed the transcripts corresponding to the expected 1779 and 500 bp for total and partial amplification of the P2X₇ receptor [27]. As a control, bands of the same sizes were revealed by RT-PCR in the interferon gamma/lipopolysaccharide-stimulated THP-1 cell line which is known to express the P2X₇ receptor under these conditions [50].

3.3 *Effect of 4-AP on the uptake of the ethidium cation in Jurkat cells*

In the next series of experiments, we investigated whether 4-AP triggered the uptake of ethidium bromide in Jurkat cells. The cells bathing in a Mg²⁺-free ethidium bromide-containing medium were exposed to 4-AP and the changes generated by the binding of ethidium to DNA and RNA was recorded. Results showed (Fig. 3) that 4-AP triggered time- and concentration-dependent linear increases in mean fluorescence intensities of Jurkat cells (Fig. 3A).

Figure 3

BzATP also caused time- and concentration-dependent increases in mean fluorescence intensities of Jurkat cells (Fig. 3A). Ethidium bromide did not enter the cells in the absence of ATP (Fig. 3A). In contrast to the uptake of ethidium bromide, 4-AP did not induce cell entry of propidium iodide. Results showed (Fig. 3B) that the levels of mean fluorescence intensities in untreated cells or in cells that had been exposed to 4-AP (5 mM) were identical, suggesting that 4-AP induced the formation of a pore of restricted size in Jurkat cells (Fig. 3B). Similar results were obtained by stimulating the cells with ATP, with the maximal effect obtained at 1 mM and a decrease of the level of fluorescence for 5 or 10 mM concentrations of ATP, in agreement with the results of Humphreys and colleagues [51] (data not shown). The uptake of the ethidium cation by Jurkat cells was also analyzed by photomicrographic recordings of the changes in fluorescence in individual Jurkat cells exposed to 4-AP. Data clearly showed an increase in fluorescence in all the cells (Fig. 3C). The average changes in fluorescence in individual Jurkat cells were plotted as a function of time and results showed that the uptake of the ethidium cation was triggered within 5 min of the addition of 4-AP (Fig. 3D).

3.4 *4-AP triggers the uptake of ethidium bromide in CHO-K1 cells transfected with the rat P2X₇R*

The bulk of the experiments described above suggested that the effects of 4-AP on Jurkat T cells were similar to those resulting from activation of the P2X₇R. To test whether 4-AP had a direct effect on P2X₇R, we used various cells lines transiently transfected with an empty pcDNA3 vector (control) or with the rat P2X₇R. Results of cytofluorimetric analysis showed that the application of 4-AP induced time- and concentration-dependent increases in the uptake of ethidium in CHO-K1 cells transfected with the rat P2X₇R (Fig. 4A).

Figure 4

Furthermore, the application of BzATP triggered an increase in ethidium uptake (Fig. 4A), in agreement with the agonist effect of BzATP on P2X₇R. CHO-K1 cells transfected with the empty pcDNA3 vector showed a weak response to BzATP and to 4-AP (Fig. 4B). These results were in agreement with the report that CHO-K1 cells express low levels of P2X₇R [52]. Individual CHO-K1 cells transfected with the rat P2X₇R were also analyzed for their capacity to take up ethidium in response to 4-AP. The data clearly indicated that the addition of 4-AP induced a rapid increase in cell fluorescence (Fig. 4C). The time-dependent variation in cell fluorescence is illustrated in Fig. 4D.

3.5 Differential responses to 4-AP and BzATP of COS-7 and HEK 293 cells transiently transfected with the rat P2X₇R

We next tested the effects of 4-AP and BzATP on simian (COS-7) and human (HEK 293) cell lines transfected with the pcDNA3 vector encoding the rat P2X₇R. Results showed that COS-7 cells transfected with the empty vector did not take up the ethidium bromide dye in response to BzATP suggesting that this cell line did not express the P2X₇R (Figure 5A).

Figure 5

Similar observations were made in the case of HEK 293 cells (Figure 5C). However, COS-7 cells transfected with the rat P2X₇R showed a rapid uptake of the ethidium cation in response to a challenge with BzATP (Figure 5B). Similar observations were made in the case of HEK 293 cells transfected with the rat P2X₇R (Figure 5D). Of significance, these cells failed to respond with an uptake of ethidium bromide when exposed to 4-AP (Figure 5B and Figure 5D). These observations were strongly suggestive of a host cell-related response to 4-AP with respect to the uptake of the ethidium bromide dye (Fig. 3 and Fig. 4) and the expression of the P2X₇R.

4. Discussion

Lymphocytes express P2X but not P2Y purinoceptors [53, 54]. ATP has been shown to trigger plasma membrane depolarization and increased permeability to small organic cations [19, 55], and to induce an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in lymphocytes [53]. Inactivation of the P2X₇ gene in mice does not affect their development but peritoneal macrophages from these animals fail to generate mature interleukin-1 β which results in a diminished response of cytokine signaling [26]. Other studies have shown that stimulation of macrophages with ATP leads to phagosome-lysosome fusion which circumvents mycobacterial evasion and killing of the pathogen. This process has been reported to involve the P2X₇R [56]. The addition of ATP to immune and non-immune cells that express the P2X₇R can trigger cell permeabilization and lysis [27, 57]. Other studies have shown that ATP was involved in apoptosis and in the regulation of cell differentiation in the thymus and peripheral T lymphocytes. It was suggested that the effects of ATP in these cells was the result of increasing $[Ca^{2+}]_i$ through activation of the

P2X₇R [19, 21]. In this connection, a point mutation (E496A) in the C-terminal cytoplasmic tail of the human P2X₇R impairs apoptosis in lymphocytes, suggesting that the glutamic acid residue at position 496 is required for optimal receptor assembly [58].

Ligation of the P2X₇R expressed in haematopoietic cells is associated with a large spectrum of effects, including the generation of plasma membrane blebs [59]. Activation of the rat P2X₇R expressed in HEK 293 cells rapidly (30-40 s) induces plasma membrane blebbing [60]. Here, we observed that the application of 4-AP to a Jurkat cell population induced plasma membrane blebbing (Fig. 1B) which led to cell lysis (data not shown). One additional phenomenon that could be related to a purinergic response to extracellular ATP is the formation of multinucleated giant cells resulting from plasma membrane fusion [49, 59]. This is a frequent observation during the immune response involving mononuclear phagocytes [59, 61]. The physiological relevance of this phenomenon and its underlying mechanism are not known. Here, we found that the addition of 4-AP induced occasional cell fusion of Jurkat lymphocytes that were in close contact (Fig. 1C). Cell fusions did not spontaneously occur in the absence of 4-AP. This 4-AP-dependent event may be due to the fact that Jurkat cell variant used here expressed normal levels of the P2X₇R (Fig. 1) as previously reported [62], in contrast to the spontaneous fusion observed in macrophage clones selected for high levels of expression of P2X₇R [49]. Formation of multinucleated giant cells occurs under cytokine stimulation in monocytes and macrophages, but can also be found in HL-60 and T-cell leukemic cell lines. The significance of the function and biologic activity of multinucleated giant cells is not known [63].

Some of the members of the P2X receptor family (P2X₂, P2X₄, P2X₇ and P2X₈) possess the ability to form a large pore size under low divalent ion concentrations [31, 32, 64]. In addition, permeability differences have been found depending on cell types. For example, the activation of the lymphocyte P2X₇R opens two permeation pathways, a channel for small cations such as Na⁺, K⁺ and Ca²⁺, and a pore of restricted size that is permeable to larger cations such as ethidium⁺ (314 Da) and Yo-PRO²⁺ (375 Da), but not propidium²⁺ (414 Da) [55, 60, 65]. Here, 4-AP triggered the opening of a pore that allowed the uptake of the ethidium (Fig. 3A) but not propidium (Fig. 3B) cation in Jurkat cells. Similar results were obtained in cells exposed to BzATP (Fig. 3A and Fig. 3B). Our results, in terms of kinetics and maximal response of fluorescence increases, were similar to those reported in the case of the endogenous or transfected P2X₇R [27, 48, 50, 51, 57, 65]. These data suggested that the permeation pathway opened by 4-AP displayed close similarity to the pore activated by ligation of the P2X₇ receptor.

We used different cell lines to further investigate the possibility that 4-AP activated the P2X₇R. In one series of experiments, CHO-K1 cells transfected with the rat P2X₇R responded to 4-AP or BzATP with permeation of the ethidium cation in a manner similar to that observed in the case of Jurkat cells. These observations suggested but did not formally prove that 4-AP activated P2X₇R. We tested whether the cells used as hosts of the P2X₇R could affect the response to 4-AP. To that end, two other cell lines were transfected with the rat P2X₇R. Results showed conflicting findings, dependant on the host cell line. For instance, COS-7 and HEK 293 cells transfected with the rat P2X₇R showed a rapid uptake of ethidium bromide following challenge with the P2X₇R agonist BzATP but not with 4-AP (**Figure 5**). However, 4-AP triggered an influx of Ca²⁺ in both cell lines (data not shown). Taken together, the data suggested that P2X₇R was not a

target of 4-AP. It is of interest to note that Schilling et al. [36] have reported a similar lack of correlation between the expression of the P2X₇R and the Ca²⁺ response in P2X₇R-expressing THP-1 and HEK 293 cells challenged with maitotoxin. Although 4-AP does not appear to trigger the P2X₇R directly, it cannot be formally excluded that 4-AP induces Ca²⁺ influx and pore formation through the P2X₇R. For instance, 4-AP may interact with the P2X₇R but the activation of the P2X₇R may also depend on the participation of accessory proteins or co-factors that are present in some cells and not in others. In this respect, Kim et al. [29] have identified 11 P2X₇R-associated proteins in the human embryonic kidney (HEK 293) cell line, suggesting that the P2X₇R may part of a complex assembly of intracellular proteins. If this were the case in other somatic cell lines, the presence of accessory proteins may account for their sensitivity to 4-AP. The nature of the cationic channel/pore that is activated following exposure of Jurkat lymphocytes to 4-AP remains unknown. On the one hand, data presented here showed that the pore activated by 4-AP in the Jurkat T cell line shared several of the properties of the cytolytic pore that is activated following ligation of the P2X₇R and may be even identical. On the other hand, it is possible that 4-AP may behave as the marine toxin maitotoxin which activates a pore with properties similar to the pore activated by ligation of the P2X₇ receptor [35, 36]. In this instance, the authors concluded that maitotoxin and P2X₇R ligation activated a cytolytic pore common to both stimuli [35, 36]. Investigations to distinguish between these possibilities are currently underway in our laboratories.

Acknowledgments

We are indebted to Dr. Arthur Weiss for the gift of Jurkat cells. This work was supported in part by grants from the Canadian Institutes for Health Research and the Center for Excellence Program of the University of Sherbrooke.

References

- [1] B.A. Judd and G.A. Koretzky, Antigen specific T lymphocyte activation, *Rev Immunogenet.* 2 (2000) 164-174.
- [2] A.K. Abbas, The control of T cell activation vs. tolerance, *Autoimmun. Rev.* 2 (2003) 115-118.
- [3] A. Mondino, A. Khoruts and M.K. Jenkins, The anatomy of T-cell activation and tolerance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996) 2245-2252.
- [4] H. Bour-Jordan and J.A. Blueston, CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals, *J. Clin. Immunol.* 22 (2002) 1-7.
- [5] A. Bernard, Lamy and I. Alberti, The two-signal model of T-cell activation after 30 years, *Transplantation* 73 (2002) S31-35.
- [6] B.M. Carreno and M. Collins, The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses, *Annu. Rev. Immunol.* 20 (2002) 29-53.
- [7] O. Acuto and D. Cantrell, T cell activation and the cytoskeleton, *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000) 165-184.
- [8] T. Mustelin and K. Tasken, Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases, *Biochem. J.* 371 (2003) 15-27.

- [9] L.E. Samelson, Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins, *Annu. Rev. Immunol.* 20 (2002) 371-394.
- [10] M.L. Dustin and A.C. Chan, Signaling takes shape in the immune system, *Cell* 103 (2000) 283-294.
- [11] L.P. Kane, J. Lin and A. Weiss, Signal transduction by the TCR for antigen, *Curr. Opin. Immunol.* 12 (2000) 242-249.
- [12] A.H. Guse, Ca^{2+} signaling in T-lymphocytes, *Crit. Rev. Immunol.* 18 (1998) 419-448.
- [13] R.S. Lewis, Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes, *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 497-521.
- [14] G. Bultynck, I. Sienaert, J.B. Parys, G. Callewaert, H. De Smedt, N. Boens, W. Dehaen and L. Missiaen, Pharmacology of inositol trisphosphate receptors, *Pflügers Arch.* 445 (2003) 629-642.
- [15] J.W. Putney, Jr., L.M. Broad, F.J. Braun, J.P. Lievreumont and G.S. Bird, Mechanisms of capacitative calcium entry, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 2223-2229.
- [16] D.E. Clapham, TRP channels as cellular sensors, *Nature* 426 (2003) 517-524.
- [17] T. Mustelin, K.M. Coggeshall, N. Isakov and A. Altman, T cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation, *Science* 247 (1990) 1584-1587.
- [18] O.R. Baricordi, D. Ferrari, L. Melchiorri, P. Chiozzi, S. Hanau, E. Chiari, M. Rubini and F. Di Virgilio, An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes, *Blood* 87 (1996) 682-690.
- [19] T.M. Chused, S. Apasov and M. Sitkovsky, Murine T lymphocytes modulate activity of an ATP-activated P2Z-type purinoceptor during differentiation, *J. Immunol.* 157 (1996) 1371-1380.
- [20] J. Lin, R. Krishnaraj and R.G. Kemp, Exogenous ATP enhances calcium influx in intact thymocytes, *J. Immunol.* 135 (1985) 3403-3410.
- [21] P.E. Ross, G.R. Ehrling and M.D. Cahalan, Dynamics of ATP-induced calcium signaling in single mouse thymocytes, *J. Cell Biol.* 138 (1997) 987-998.
- [22] G. Burnstock, Current status of P2X receptors: distribution and pathophysiological roles, *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 42 (1999) 119-121.
- [23] R.A. North, Molecular physiology of P2X receptors, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 1013-1067.
- [24] F. Di Virgilio, P. Chiozzi, D. Ferrari, S. Falzoni, J.M. Sanz, A. Morelli, M. Torboli, G. Bolognesi and O.R. Baricordi, Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells, *Blood* 97 (2001) 587-600.
- [25] G. Collo, S. Neidhart, E. Kawashima, M. Kosco-Vilbois, R.A. North and G. Buell, Tissue distribution of the P2X7 receptor, *Neuropharmacology* 36 (1997) 1277-1283.
- [26] M. Solle, J. Labasi, D.G. Perregaux, E. Stam, N. Petrushova, B.H. Koller, R.J. Griffiths and C.A. Gabel, Altered cytokine production in mice lacking P2X7 receptors, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 125-132.
- [27] A. Surprenant, F. Rassendren, E. Kawashima, R.A. North and G. Buell, The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7), *Science* 272 (1996) 735-738.

- [28] L.C. Denlinger, P.L. Fisette, J.A. Sommer, J.J. Watters, U. Prabhu, G.R. Dubyak, R.A. Proctor and P.J. Bertics, Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide, *J. Immunol.* 167 (2001) 1871-1876.
- [29] M. Kim, L.H. Jiang, H.L. Wilson, R.A. North and A. Surprenant, Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex, *EMBO J.* 20 (2001) 6347-6358.
- [30] G.E. Torres, T.M. Egan and M.M. Voigt, Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 6653-6659.
- [31] C. Virginio, A. MacKenzie, F.A. Rassendren, R.A. North and A. Surprenant, Pore dilation of neuronal P2X receptor channels, *Nat. Neurosci.* 2 (1999) 315-321.
- [32] P.J. Jensik, D. Holbird, M.W. Collard and T.C. Cox, Cloning and characterization of a functional P2X receptor from larval bullfrog skin, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281 (2001) C954-962.
- [33] X. Bo, R. Schoepfer and G. Burnstock, Molecular cloning and characterization of a novel ATP P2X receptor subtype from embryonic chick skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 14401-14407.
- [34] S. Petrou, M. Ugur, R.M. Drummond, J.J. Singer and J.V. Walsh, Jr., P2X7 purinoceptor expression in *Xenopus* oocytes is not sufficient to produce a pore-forming P2Z-like phenotype, *FEBS Lett.* 411 (1997) 339-345.
- [35] W.P. Schilling, W.G. Sinkins and M. Estacion, Maitotoxin activates a nonselective cation channel and a P2Z/P2X7-like cytolytic pore in human skin fibroblasts, *Am. J. Physiol.* 277 (1999) C755-765.
- [36] W.P. Schilling, T. Wasylyna, G.R. Dubyak, B.D. Humphreys and W.G. Sinkins, Maitotoxin and P2Z/P2X7 purinergic receptor stimulation activate a common cytolytic pore, *Am. J. Physiol.* 277 (1999) C766-776.
- [37] F. Di Virgilio, P. Chiozzi, S. Falzoni, D. Ferrari, J.M. Sanz, V. Venketaraman and O.R. Baricordi, Cytolytic P2X purinoceptors, *Cell Death Differ.* 5 (1998) 191-199.
- [38] H.L. Wilson, S.A. Wilson, A. Surprenant and R.A. North, Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X7 receptor C terminus, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 34017-34023.
- [39] K. Whittle and S. Gallacher, Marine toxins, *Br. Med. Bull.* 56 (2000) 236-253.
- [40] C. Aussel, C. Pelassy, D. Mary, D. Choquet and B. Rossi, Regulation of interleukin-2 production and phosphatidylserine synthesis in Jurkat T lymphocytes by K⁺ channel antagonists, *Immunopharmacol.* 20 (1990) 97-103.
- [41] T.E. DeCoursey, K.G. Chandy, S. Gupta and M.D. Cahalan, Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis?, *Nature* 307 (1984) 465-468.
- [42] C.S. Lin, R.C. Boltz, J.T. Blake, M. Nguyen, A. Talento, P.A. Fischer, M.S. Springer, N.H. Sigal, R.S. Slaughter, M.L. Garcia and et al., Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation, *J. Exp. Med.* 177 (1993) 637-645.
- [43] J.M. Witkowski, J. Siebert, K. Lukaszuk and L. Trawicka, Comparison of effect of a panel of membrane channel blockers on the proliferative, cytotoxic and

- cytoadherence abilities of human peripheral blood lymphocytes, *Immunopharmacology* 26 (1993) 53-63.
- [44] A.H. Guse, E. Roth and F. Emmrich, Ca^{2+} release and Ca^{2+} entry induced by rapid cytosolic alkalization in Jurkat T-lymphocytes, *Biochem. J.* 301 (1994) 83-88.
- [45] E. Barbar, M. Rola-Pleszczynski, M.D. Payet and G. Dupuis, Protein kinase C inhibits the transplasma membrane influx of Ca^{2+} triggered by 4-aminopyridine in Jurkat T lymphocytes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1622 (2003) 89-98.
- [46] C.E. Ahnadi, P. Giguère, S. Gravel, D. Gagne, A.C. Goulet, T. Fulop, Jr., M.D. Payet and G. Dupuis, Chronic PMA treatment of Jurkat T lymphocytes results in decreased protein tyrosine phosphorylation and inhibition of CD3- but not Ti-dependent antibody-triggered Ca^{2+} signaling, *J. Leukoc. Biol.* 68 (2000) 293-300.
- [47] A. Perron, Z.G. Chen, D. Gingras, D.J. Dupre, J. Stankova and M. Rola-Pleszczynski, Agonist-independent desensitization and internalization of the human platelet-activating factor receptor by coumermycin-gyrase B-induced dimerization, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 27956-27965.
- [48] J.S. Wiley, C.E. Gargett, W. Zhang, M.B. Snook and G.P. Jamieson, Partial agonists and antagonists reveal a second permeability state of human lymphocyte P2Z/P2X7 channel, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) C1224-1231.
- [49] P. Chiozzi, J.M. Sanz, D. Ferrari, S. Falzoni, A. Aleotti, G.N. Buell, G. Collo and F. Di Virgilio, Spontaneous cell fusion in macrophage cultures expressing high levels of the P2Z/P2X7 receptor, *J. Cell. Biol.* 138 (1997) 697-706.
- [50] B.D. Humphreys and G.R. Dubyak, Modulation of P2X7 nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes, *J. Leukoc. Biol.* 64 (1998) 265-273.
- [51] B.D. Humphreys, C. Virginio, A. Surprenant, J. Rice and G.R. Dubyak, Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues, *Mol. Pharmacol.* 54 (1998) 22-32.
- [52] A.D. Michel, I.P. Chessell, A.D. Hibell, J. Simon and P.P. Humphrey, Identification and characterization of an endogenous P2X7 (P2Z) receptor in CHO-K1 cells, *Br. J. Pharmacol.* 125 (1998) 1194-1201.
- [53] C. El-Moatassim, T. Maurice, J.C. Mani and J. Dornand, The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase induced in murine thymocytes by extracellular ATP does not involve ATP hydrolysis and is not related to phosphoinositide metabolism, *FEBS Lett.* 242 (1989) 391-396.
- [54] B.D. Freedman, Q.H. Liu, G. Gaulton, M.I. Kotlikoff, J. Hescheler and B.K. Fleischmann, ATP-evoked Ca^{2+} transients and currents in murine thymocytes: possible role for P2X receptors in death by neglect, *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 1635-1646.
- [55] J.S. Wiley, R. Chen and G.P. Jamieson, The ATP4- receptor-operated channel (P2Z class) of human lymphocytes allows Ba^{2+} and ethidium⁺ uptake: inhibition of fluxes by suramin, *Arch. Biochem. Biophys.* 305 (1993) 54-60.
- [56] I.P. Fairbairn, C.B. Stober, D.S. Kumararatne and D.A. Lammas, ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X7-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion, *J. Immunol.* 167 (2001) 3300-3307.

- [57] L.C. Nuttle and G.R. Dubyak, Differential activation of cation channels and non-selective pores by macrophage P2z purinergic receptors expressed in *Xenopus* oocytes, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 13988-13996.
- [58] B.J. Gu, W. Zhang, R.A. Worthington, R. Sluyter, P. Dao-Ung, S. Petrou, J.A. Barden and J.S. Wiley, A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X₇ receptor, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 11135-11142.
- [59] S. Falzoni, P. Chiozzi, D. Ferrari, G. Buell and F. Di Virgilio, P2X₇ receptor and polykation formation, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 3169-3176.
- [60] C. Virginio, A. MacKenzie, R.A. North and A. Surprenant, Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X₇ receptor, *J. Physiol.* 519 (1999) 335-346.
- [61] S. Fais, V.L. Burgio, M.R. Capobianchi, S. Gessani, F. Pallone and F. Belardelli, The biological relevance of polykaryons in the immune response, *Immunol. Today* 18 (1997) 522-527.
- [62] W.H. Loomis, S. Namiki, R.S. Ostrom, P.A. Insel and W.G. Junger, Hypertonic stress increases T cell interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release, P₂ receptor, and p38 MAPK activation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 4590-4596.
- [63] J.M. Anderson, Multinucleated giant cells, *Curr Opin Hematol* 7 (2000) 40-47.
- [64] B.S. Khakh, X.R. Bao, C. Labarca and H.A. Lester, Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds, *Nat. Neurosci.* 2 (1999) 322-330.
- [65] B.J. Gu, W.Y. Zhang, L.J. Bendall, I.P. Chessell, G.N. Buell and J.S. Wiley, Expression of P2X₇ purinoceptors on human lymphocytes and monocytes: evidence for nonfunctional P2X₇ receptors, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279 (2000) C1189-1197.

LEGEND TO FIGURES

Fig. 1. Plasma membrane blebbing and cell fusion induced by 4-AP in Jurkat T lymphocytes. The cells were loaded with the Fura-2 dye and microphotographs were recorded, (A) before the addition of 4-AP (5 mM) and, (B) 4 min after the addition of 4-AP. (C) Microphotographs recorded under visible light showing the fusion of two Jurkat lymphocytes induced by 4-AP (5 mM). The cells bathed (37°C) in a Mg²⁺-free HEPES-buffered KCl (150 mM) medium. Microphotographs were recorded as a function of time, as indicated.

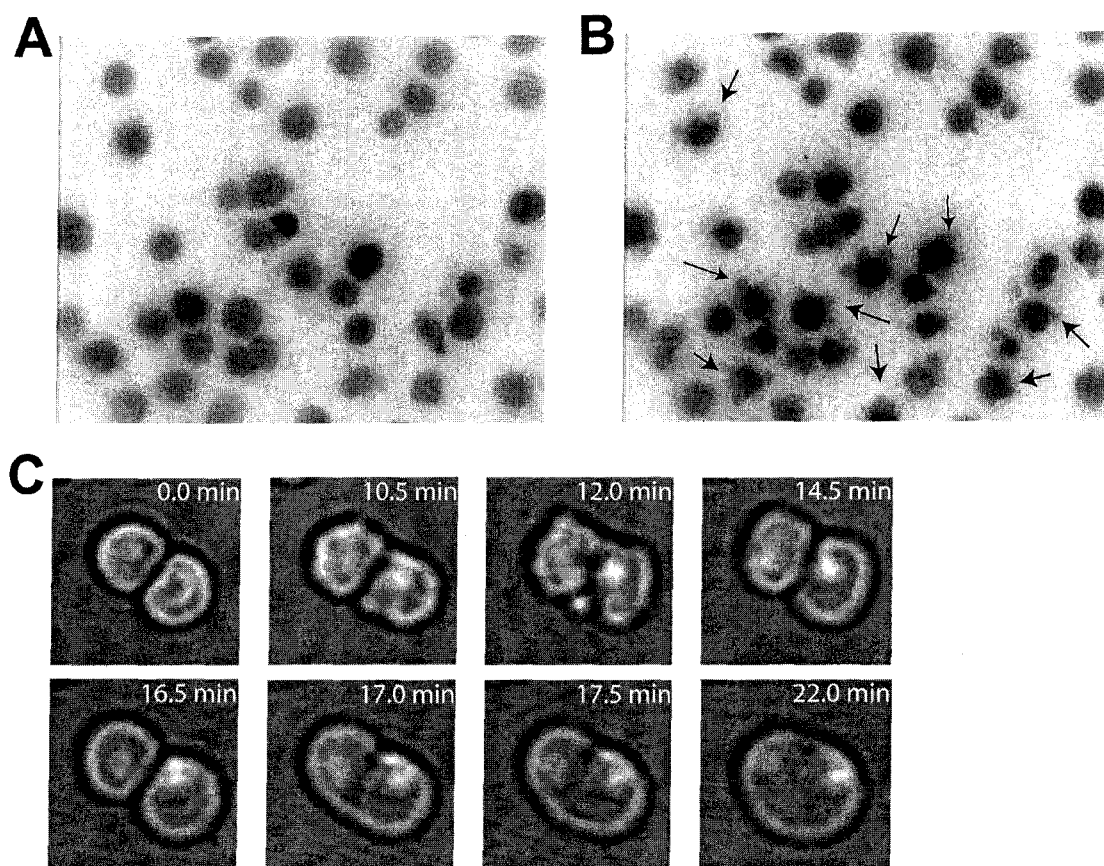
Fig. 2. RT-PCR amplification of the P2X₇ receptor in Jurkat T lymphocytes and THP-1 cells. Synthetic oligonucleotides were used (see Materials and Methods) to amplify the full length (1779 bp) and a partial length (500 bp) of the cDNA corresponding to the human P2X₇ receptor. Numbers on the left of the figure indicate the sizes of DNA markers whereas those to the right indicate the size of the amplification products obtained after electrophoretic separation on an agarose gel.

Fig. 3. Uptake of cationic dyes by Jurkat lymphocytes challenged with 4-AP and BzATP. (A) Kinetics of the changes in fluorescence recorded by cytofluorimetry after application

of 1 (◆), 5 (▼) or 10 (■) mM concentration of 4-AP, or 150 (△) or 300 (○) μ M concentrations of BzATP. The cells (1×10^6 lymphocytes) bathed in 1 ml of a HEPES-buffered KCl (150 mM) medium containing ethidium bromide (30 μ M). Control (●) corresponds to the absence of 4-AP or BzATP. The experiments were performed at 37°C. (B) Uptake of ethidium bromide or propidium iodide in response to 4-AP. The figures shows the changes in fluorescence recorded by cytofluorimetry of the uptake of ethidium bromide (●) or propidium iodide (○) in the absence of 4-AP or the uptake of ethidium bromide (▼) or propidium iodide (△) in the presence of 4-AP (5 mM). The cells bathed in a HEPES-buffered KCl (150 mM) medium containing ethidium bromide (30 μ M) or propidium iodide (30 μ M). (C) Microphotographs of Jurkat lymphocytes bathing in a HEPES-buffered KCl (150 mM) medium (37°C) containing ethidium bromide (30 μ M) and, after a period of equilibration, 4-AP (5 mM) was added. Microphotographs were taken (a) before, (b) 3 min and (c) 9 min after the addition of 4-AP. (D) Kinetics of the changes in cell fluorescence recorded every 30 s in experiments shown in (C). The arrow indicates the time of application of 4-AP.

Fig. 4. Uptake of cationic dyes in CHO-K1 cells transfected with the pcDNA3 vector encoding the rat P2X₇ receptor. (A) Kinetics of the changes in fluorescence triggered by 5 (▼), 7 (▲) and 10 (■) mM concentrations of 4-AP, 150 (○) and 300 (△) μ M concentrations of BzATP, or in the absence of stimulus (●). The cells bathed in a Mg²⁺-free HEPES-buffered KCl (150 mM) medium containing ethidium bromide (30 μ M). (B) CHO-K1 cells transfected with the pcDNA3 vector (control) were exposed to 4-AP (7 mM, ▲; 10 mM, ■), to BzATP (300 μ M, △) or were left unchallenged (●). The cells bathed in a Mg²⁺-free HEPES-buffered KCl (150 mM) medium containing propidium iodide (30 μ M). (C) Microphotographs of CHO cells transfected with the pcDNA3 vector encoding the rat P2X₇ receptor and exposed to 4-AP (5 mM) in a medium containing ethidium bromide (30 μ M). Pictures were recorded (a) under control conditions (absence of 4-AP), (b) 3 min and (c) 13 min after the application of 4-AP. (D) Kinetics of the changes in cell fluorescence recorded every 30 s in experiments shown in (C). The arrow indicates the time of application of 4-AP.

Figure 5. Uptake of ethidium bromide in COS-7 and HEK 293 cells transfected with the pcDNA3 vector encoding the rat P2X₇ receptor. The cells bathed in a HEPES-BSS medium containing ethidium bromide (30 μ M), in a chamber mounted on an inverted fluorescence microscope, at 37°C. (A) COS-7 and (C) HEK 293 cells transfected with the pcDNA3 vector (control) were kept for 48 h and then exposed to 4-AP (5 mM) and BzATP (300 μ M), as indicated by the arrows. (B) COS-7 and (D) HEK 293 cells transfected with the pcDNA3 vector encoding the rat P2X₇ receptor were kept for 48 h and then challenged with 4-AP (5 mM) and BzATP (300 μ M), as indicated by the arrows. Changes in fluorescence intensities were recorded and quantitated by gating on a field containing at least 20 cells.

**Figure 1**

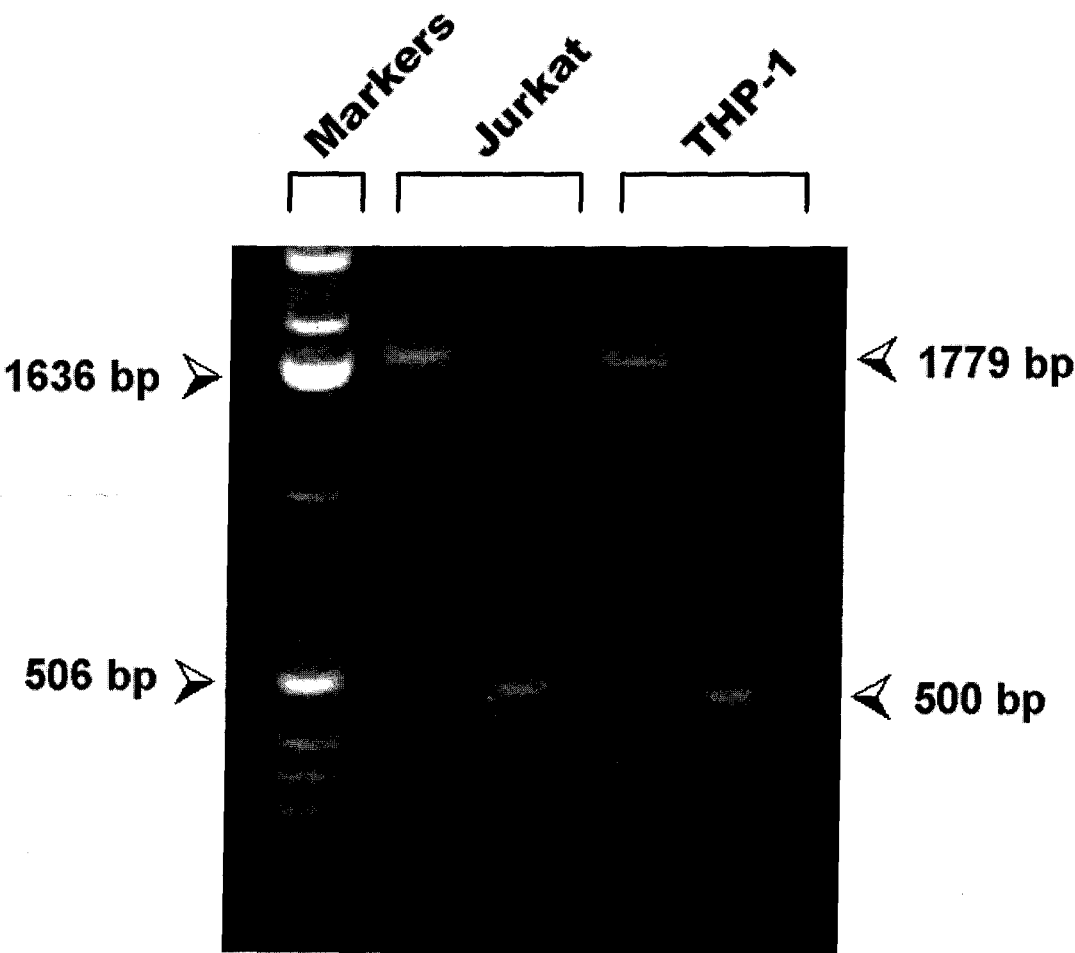


Figure 2

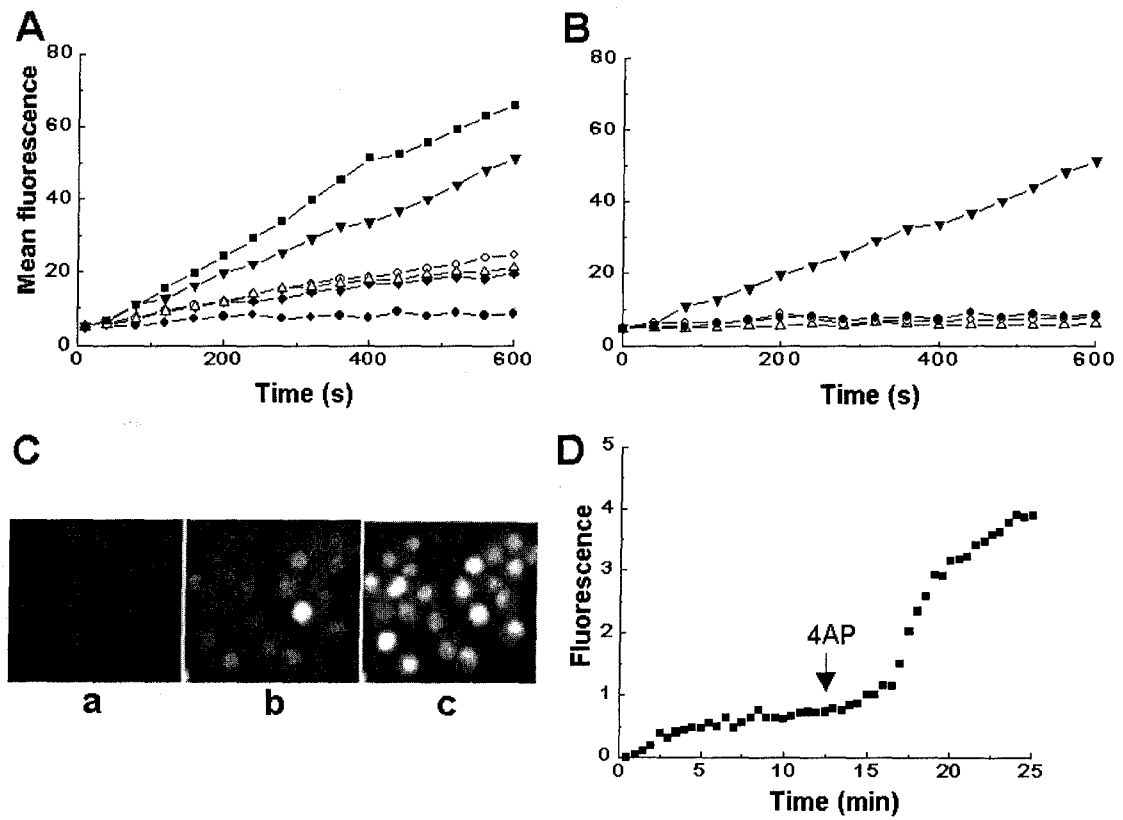


Figure 3

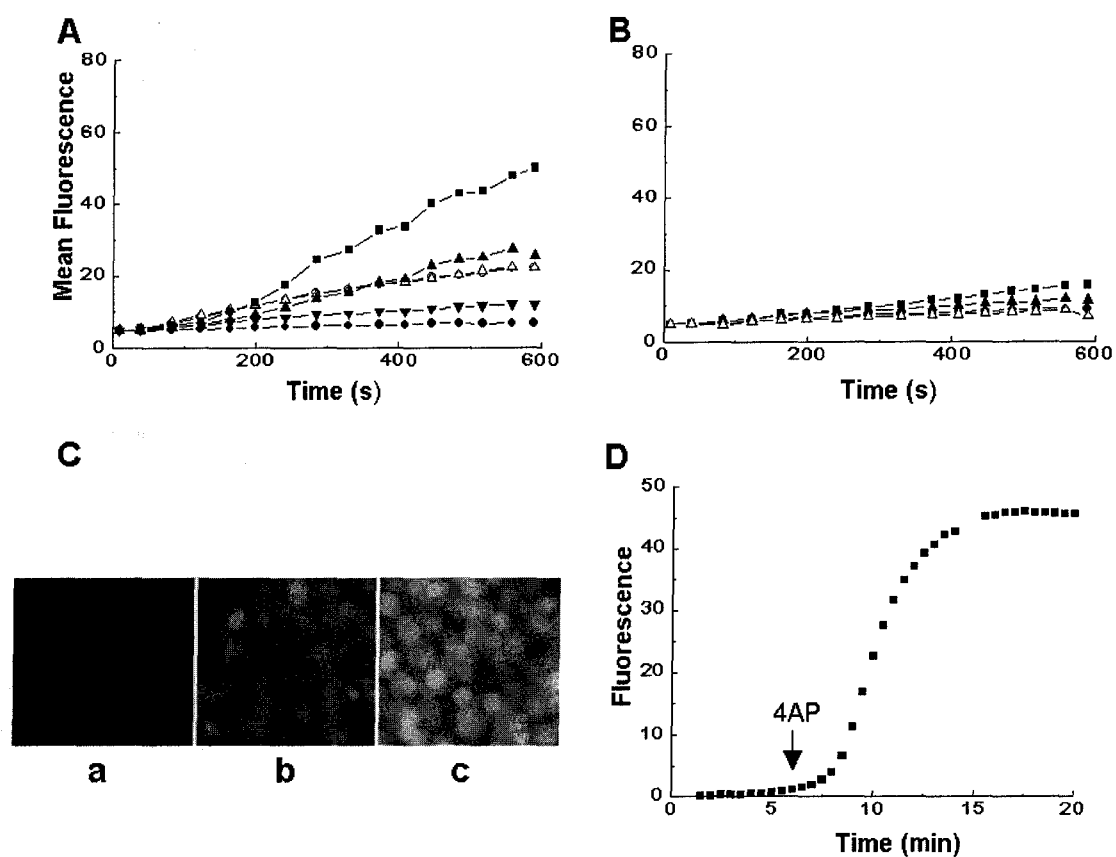
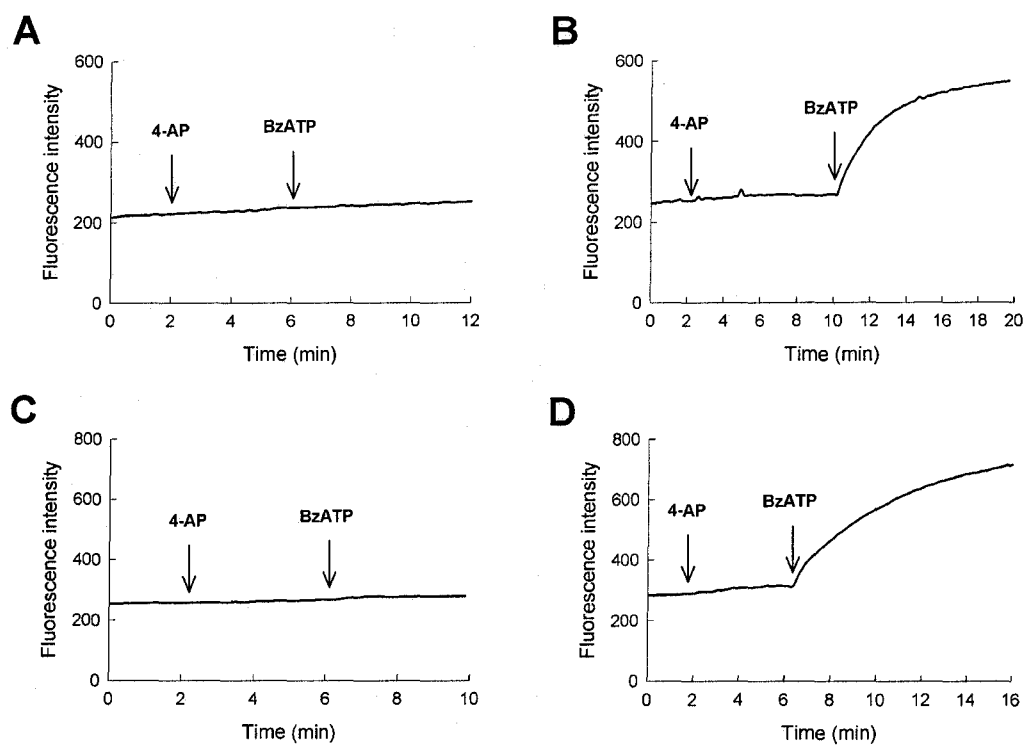


Figure 4

**Figure 5**

Manuscrit II

Barbar, É., Rola-Pleszczynski, M., Payet, M. D. et Dupuis, G. (2004) 4-Aminopyridine activates the intrinsic pathway of apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *Cellular Signalling*, article soumis pour publication.

Préambule

Ce manuscrit décrit le mécanisme de la mort cellulaire programmée induite par la 4-AP chez le lymphocyte Jurkat. La 4-AP active la voie intrinsèque de l'apoptose, caractérisée par une perte du potentiel membranaire mitochondrial, une externalisation de la phosphatidylsérine et une fragmentation de l'ADN. Nous montrons que cette voie est dépendante de l'activation des caspases-3, -6 et -9, et non de la caspase-8. J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans ce manuscrit.

1. Introduction

The term apoptosis was coined in the early '70s [1] to designate a process of programmed cell death [2]. Apoptosis is a physiological process that is triggered by internal or external stimuli and that is associated with characteristic morphological changes. The hallmarks of apoptosis are plasma membrane blebbing, chromatin condensation, nuclear fragmentation, loss of adhesion and rounding in adherent cells and, cell shrinkage [3]. These changes are the results of a series of biochemical events that include genomic DNA fragmentation [4, 5], plasma membrane disruption and phosphatidylserine (¹PS) externalization [6] and, proteolytic cleavage of intracellular components [7]. In contrast, cell necrosis or accidental-type cell death is the result of gross cell injury [3]. Necrotic cells display distinctive characteristics which include cell and mitochondria swelling, extensive plasma membrane disorganization and, the absence of nuclear alterations [8]. Necrotic cells release their intracellular contents which can lead to local or systemic inflammatory reactions [9] and cause several autoimmune diseases [10]. Apoptosis is a crucial process for eliminating damaged, old or unuseful cells [6]. A lack of regulation of the apoptotic process may lead to autoimmune disorders, cancer and neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease and acquired immuno deficiencies [8]. Cells undergoing apoptosis are rapidly engulfed by macrophages or by healthy neighboring non-professional phagocytes which recognize apoptotic signals on dying cells [11, 12]. The major apoptotic cue is given by the cell surface exposure of PS, a phospholipid normally confined to the inner leaflet of the plasma membrane bilayer. Cells expressing the PS receptor have been suggested to be involved in the removal of apoptotic cells [13].

Programmed cell death is initiated by two separate pathways depending on the nature of the triggering signal. Occupation of the TNF superfamily of death receptors initiates the activation of the extrinsic pathway of apoptosis. Six members of death receptors are known, TNF-R1 (CD120a), CD95 (APO-1 or Fas), DR3 (APO-3, LARD, TRAMP, WSL1), and the TRAIL receptors TRAIL-R1 (APO-2, DR4), TRAIL-R2 (DR5, KILLER, TRICK2), and DR6 [14, 15]. The activation of these receptors leads to the recruitment and activation of several aspartyl-specific cysteine proteases, collectively known as caspases. Caspases are synthesized as proenzymes (zymogens) and are activated by proteolytic cleavage. Fourteen mammalian caspases have been described [16]. The active enzyme is formed by two large subunits containing the active site, and two small subunits, as inferred from the crystal structures of caspase-1, caspase-3 and caspase-8 [16].

The intrinsic (or mitochondrial) pathway of apoptosis involves the participation of mitochondria and the release of cytochrome c. This pathway can be activated by external death signals, such as serum starvation, radiation or chemotherapy agents. In addition, intracellular death signals triggered by DNA damaging agents or protein kinase inhibitors can initiate this pathway [17]. Activation of the intrinsic pathway leads to the dissipation of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) [18] and the opening of a mitochondrial permeability transition pore which is regulated by several proteins of the Bcl-2 family [17]. Cytochrome c, normally confined exclusively to the intermembrane space of mitochondria, is then released into the cytosol where it forms a complex (apoptosome) with Apaf-1 and procaspase-9 [19]. Cytochrome c is active only in this holoenzymatic

form, in an ATP-dependant manner [20] oxidized state [21], and it is not dependent of its redox state as previously suggested [22].

The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways mainly induced by the initiator caspase-8 or caspase-9 respectively converge to the activation of the executor caspase-3. The caspase-activated DNase (CAD/DFF-40) that is normally retained in the cytoplasm by the chaperone ICAD/DFF-45 translocates to the nucleus as a result of caspase-dependent degradation of ICAD/DFF-45 [23, 24]. The DNA fragmentation that ensues is strictly dependent on the activity of caspase-3 [25]. Some forms of programmed cell death are independent of caspase activation [23, 26]. For example, apoptotic stimuli of T lymphocytes such as exposure to anti-CD2 antibodies or staurosporine do not induce caspase-specific proteolytic activity although the classical features of apoptosis are present. For instance, the chromatin becomes partially condensed, the DNA is not fragmented and the maturation of apoptotic bodies is arrested [27].

Blockers of voltage-gated K^+ channels have been studied extensively for their role in modulating lymphocyte responses and proliferation [28]. For example, K^+ channel blockers such as quinine, 4-AP, TEA and CbTx have been reported to inhibit interleukin-2 synthesis and to suppress human T lymphocytes proliferation [29-31] *in vitro*. In addition, TEA and 4-AP have been reported to inhibit the proliferation of murine Th and cytotoxic T cells, P-815 and SP2/0 tumor cells [32], and the development of cytotoxic T lymphocytes as well as their cytotoxic properties [33]. Aminopyridines produce their effects when present in their cationic form [34, 35]. In the case of 4-AP, it has been shown that it diffuses across the plasma membrane in its uncharged form and acts within the interior of the cell in its cationic form which displays high affinity for the open state of the K^+ channels resulting in their blockade [35, 36]. Beside its K^+ channel blocking effect, 4-AP has been shown to reduce viability and proliferation in malignant astrocytoma cell lines [37], cultured cortical neurons [38] and HepG2 human hepatoblastoma cells [39]. One additional effect of 4-AP has been described by Guse et al. [40] who showed that 4-AP induced an entry of Ca^{2+} in Jurkat T lymphocytes. We have reported that the increase in $[Ca^{2+}]_i$ triggered by 4-AP in Jurkat cells was solely due to a transplasma membrane influx of Ca^{2+} that was modulated by protein kinase C and serine/threonine phosphatases [41]. Here, we report additional effects of 4-AP on Jurkat T lymphocytes. We present evidence that 4-AP triggered apoptosis in these cells by activating the intrinsic pathway. We further show that the 4-AP-dependent effects were not due to its property as a K^+ channel blocker, its capacity to trigger Ca^{2+} influx or its ability to increase intracellular pH.

2. Materials and methods

2.1 Reagents and solutions

4-AP, TEA, charybdotoxin and ionomycin were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). DiOC₆(3) was from Molecular Probes (Eugene, OR). Caspase inhibitors and caspase fluorescent substrates were from EMD Biosciences (San Diego, CA). FITC-conjugated Annexin V was obtained from BD Biosciences (Mississauga, ON). Other chemicals were from Sigma-Aldrich or from local suppliers. mAb C305 was prepared from the supernatant of a murine C305.2 hybridoma generously supplied by Dr. A. Weiss

(Howard Hughes Institute, University of California, San Francisco, CA), as previously described [42]. Experiments were done in a HEPES-buffered saline solution (Hepes-BSS, pH = 7.3) that contained (mM) NaCl 140, KCl 5, MgSO₄ 0.5, CaCl₂ 1, Na₂HPO₄ 1, HEPES 10 and glucose 5.5.

2.2 Cell cultures

Jurkat E6.1 cells, a gift from Dr. A. Weiss, were cultured in RPMI 1640 medium containing HEPES (10 mM), penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml) and 10% heat-inactivated (56°C, 30 min) foetal bovine serum, as described [42].

2.2 [Ca²⁺]_i quantification

Jurkat cells (5 x 10⁶ lymphocytes/ml) were loaded with Fura-2/AM (3 µM) for 1 h then washed. The cytoplasmic concentration of free Ca²⁺ was quantified as published [42].

2.3 FITC-Annexin V/Propidium iodide flow cytometry

Cell surface PS detection and plasma membrane integrity were measured by FITC-Annexin V binding and by Propidium iodide exclusion, respectively. Cells were labeled with FITC-Annexin V according to the manufacturer's instructions, using Hepes-BSS buffer for the assays. Labeled cells were analyzed for fluorescence intensity on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences). Cell debris were excluded by gating on forward and on side scatter.

2.4 Caspase assays

Jurkat cells were harvested, washed with phosphate buffered saline (PBS), resuspended in a hypotonic cell lysis buffer (25 mM HEPES, pH 7.5) containing 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 2 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 100 µg/ml AEBSF), and subjected to four cycles of freezing (liquid nitrogen) and thawing. Lysates were centrifuged and the supernatant fraction was collected for each sample. In the case of blank assays, 160 µl of caspase assay buffer (312.5 mM HEPES, pH 7.5, 31.2% sucrose, 0.3% CHAPS) were mixed with 10 µl DMSO, 50 µl DTT (100 mM aqueous stock solution) and the volume was completed to 500 µl with deionized water. In the case of caspase assays, 100 µl of the sample lysate was mixed with 160 µl of caspase assay buffer, 10 µl DMSO, 50 µl DTT (100 mM aqueous stock solution) and the volume was completed to 500 µl with deionized water. In the case of control experiments using caspase inhibitors, the sample assays had the same composition as the caspase assay mixture except that DMSO was replaced by 10 µl of the appropriate caspase inhibitor (2.5 mM stock solutions in DMSO). The samples were incubated for 1 h at 37°C, then 10 µl of the appropriate caspase fluorescent substrate (stock solutions, 2.5 mM) were added to each tube, followed by a 1 h incubation at 37°C. Fluorescence was recorded on a spectrofluorimeter (SPF-500C; SLM Aminco, Urbana, IL) within 2 h of the addition of substrate. AFC (7-amino-4-trifluoromethyl coumarin) derivatives were excited at 400 nm and emission fluorescence was collected at 510 nm whereas AMC (7-

amino-4-methyl coumarin) derivatives were excited at 360 nm and emission fluorescence was collected at 460 nm. Relative fluorescence units (RFU) were calculated for each sample according to the equation (FU are fluorescence units),

$$\text{RFU} = [(\text{FU}) - (\text{FU of the blank})] / [(\text{FU in assays containing inhibitors}) - (\text{FU of the blank})]$$

2.5 DNA laddering assay

DNA fragmentation assays were done according to the method of Gong et al. [43]. Briefly, 2×10^6 cells were transferred into 1 ml of 70% aqueous ethanol and stored at -20°C for 24 h or longer. Ethanol was removed thoroughly and cells were pelleted, resuspended and lysed for 30 min in 40 μl of a phosphate-citrate buffer, consisting of 192 parts of 0.2 M Na_2HPO_4 and 8 parts of 0.1 M citric acid (pH 7.8). The samples were centrifuged and the supernatants were transferred to new tubes and treated with 3 μl of 0.25% aqueous Nonidet P-40 and 3 μg of RNase (aqueous stock solution, 1 mg/ml) for 30-60 min at 37°C , followed by the addition of 3 μl of proteinase K (aqueous stock solution, 1 mg/ml) for another 30-60 min at 37°C . Samples were resolved on a 1.2% TBE agarose gel and DNA was detected under UV light illumination of ethidium bromide staining.

2.6 Mitochondrial membrane potential flow cytometry

Disruption of the mitochondrial membrane potential was measured using DiOC6(3) labeling as described [44]. Jurkat cells were stained without fixation with DiOC6(3) (40 nM, stock solution in DMSO) for 30 min at 37°C , washed with Hepes-BSS buffer and analyzed by flow cytometry as described above.

2.7 Statistical analysis

Results were verified for statistical normal distribution and analyzed with Student's *t*-test for unpaired data, using the SigmaStat software (SPSS Inc., Chicago, IL). Results are shown as the average \pm S.D. Significance was set at the 95% confidence level.

3. Results

3.1 4-AP causes PS externalization and DNA fragmentation in Jurkat cells

One of the early events of apoptosis is a relocation of PS from the inner leaflet of the plasma membrane to the outer leaflet. The extent of the externalization of PS can be detected with fluorescent derivatives of Annexin V which has a high affinity for PS. The cell impermeant Propidium iodide (PI) is excluded in live cells but not dead or damaged cells. Whereas double labeled events (PI- and FITC-Annexin V-positive) are characteristic of necrotic cells, single FITC-Annexin V-positive events correspond to cells undergoing apoptosis. A number of investigators have reported that 4-AP decreased

viability of astrocyte cell lines [37], cultured cortical neurons [38] and HepG2 human hepatoblastoma cells [39]. We asked the question whether 4-AP would have a similar effect in the human CD4⁺ Jurkat T cell line. Results showed that 7% of an untreated Jurkat cell population stained positive for PS (Fig. 1A). In marked contrast, a 3 h exposure of Jurkat cells to 4-AP (5 mM) resulted in 21% of the cell population staining positive for PS (Fig. 1B). There was no staining of the cells to PI under these conditions. These observations suggested that 4-AP did not trigger a necrotic effect in Jurkat cells but that it induced apoptotic death. A hallmark of apoptosis is degradation of cellular proteins and nuclear components including DNA. Genomic DNA is cleaved into multiples of 180 bp fragments that correspond to internucleosomal spacing [5] and that can be revealed by electrophoretic separation on agarose gels. Here, treating Jurkat T cells with 4-AP (5 mM) showed a time-dependent increase in DNA fragmentation, illustrated by the appearance of a laddering pattern that was detectable 90 min after treatment and that was markedly increased after 2 h of treatment. Basal DNA fragmentation slightly occurred and was detected in untreated cells after 2 h (Fig. 2). The bulk of the data from Fig. 1 and Fig. 2 supported the interpretation that 4-AP triggered the apoptotic death of Jurkat cells.

3.2 4-AP- induced PS externalization is not caused by increases in $[Ca^{2+}]_i$

Kim et al. [39] have suggested that cytoplasmic Ca^{2+} is involved in the 4-AP-dependent induction of apoptosis in the HepG2 human hepatoblastoma cell line. We asked the question whether the 4-AP-induced apoptosis in Jurkat lymphocytes was associated with its property to trigger an influx of Ca^{2+} . The effects of increases in $[Ca^{2+}]_i$ in Jurkat cells on the externalization of PS were assessed using two different approaches. Jurkat cells were challenged with mAb C305, an IgM-class mAb directed against the β -subunit of the T cell receptor which triggers an inositol-1,4,5-triphosphate-dependent [42] Ca^{2+} response that can be maintained for an extended period of time. Data showed that the mAb C305-dependent Ca^{2+} response could be sustained for at least 30 min under our conditions of assay (Fig. 3A). However, the sustained elevation of $[Ca^{2+}]_i$ was not accompanied with the detection of FITC-Annexin V-positive Jurkat cells (7%, Fig. 3C) which were identical in number (7%) to untreated cells (Fig. 3B). The Ca^{2+} ionophore ionomycin was used as a second approach to raise $[Ca^{2+}]_i$ in Jurkat cells [45]. In this instance, the percentage of PS-positive cells (8%) (Fig. 3D) was not different than control. These data suggested increased $[Ca^{2+}]_i$ was not the cause of apoptosis in Jurkat cells exposed to 4-AP. There was no staining of the cells to PI under the various experimental conditions (Fig. 3).

3.3 4-AP- induced PS exposure is not caused by K^+ channel blockade or increased pH_i

To assess whether the externalization of PS was caused by the K^+ channel blocking property of 4-AP, we investigated the effects of the two widely used K^+ channel blockers TEA and CbTx. Results showed that TEA had no influence on the percentage of FITC-Annexin V-positive (7%, Fig. 4B) Jurkat cells as compared to untreated (7%, Fig. 4A) cells. Similar observations were made when the cells had been exposed to CbTx (7%, Fig. 4C). Changes in cytosolic pH have been shown to modulate caspase activation during apoptosis in a number of cell lines [46]. The report that 4-AP triggers a rise in pH_i

[40] prompted us to investigate whether 4-AP-dependent Jurkat cell alkalinization contribute to apoptosis. We exposed the cells to NH_4Cl , a treatment known to increase pH_i [47, 48]. Results showed that NH_4Cl did not increase the percentage of FITC-Annexin V-positive (8%) cells as compared to untreated cells (Fig. 4D). There was no staining of the cells to PI under the various experimental conditions (Fig. 4).

3.4 4-AP- induced PS externalization is not caused by a combination of K^+ channel blockade and increased pH_i

These results reported above suggested that the intracellular alkalinization and K^+ channel blockade were not responsible for 4-AP-dependent PS externalization in Jurkat cells. To add further weight to this interpretation, we used a series of combinations of ionomycin, CbTx and NH_4Cl to simulate the simultaneous effects of 4-AP on Ca^{2+} entry, K^+ channel blockade and increased pH_i . Results showed (Fig. 5B) that exposing the cells to a combination of ionomycin and CbTx did not increase the percentage (6%) of FITC-Annexin V-positive cells as compared to control (Fig. 5A). Similarly, a combination of ionomycin and NH_4Cl did not increase the percentage (6%) of FITC-Annexin V-positive cells (Fig. 5C) as compared to control. A combination of CbTx and NH_4Cl had no significant effects on the percentage (6%) of FITC-Annexin V-positive cells (Fig. 5D). Of significance, a combination of ionomycin, NH_4Cl and CbTx did not induce PS externalization (Fig. 5E). In all these experiments, there was no staining of the cells to Propidium iodide (Fig. 5).

3.5 4-AP activates selected caspases in Jurkat cells

Apoptotic cell death is initiated and executed by activated caspases [49]. We asked the question whether caspases were involved in the 4-AP-induced externalization of PS. The percentage of FITC-Annexin V-positive cells was 5% in untreated cells (Fig. 6A) whereas the value was 20% of the cell population in 4-AP (5 mM) -treated cells (Fig. 6B). Pretreating Jurkat cells with the pan-caspase inhibitor Z-VAD.FMK (50 μM) prevented (FITC-Annexin V-positive cells, 3%) the effect of 4-AP (Fig. 6C). These observations suggested that caspases were activated when Jurkat cells were challenged with 4-AP. We used a series of selective peptide inhibitors of caspases to determine the contribution of members of the caspase cascade. Peptide inhibitors of caspase-8 and caspase-9, a peptide inhibitor of the central executioner caspase-3, and a peptide inhibitor of caspase-6 that is activated by caspase-3 were tested. A pretreatment of Jurkat cells with caspase-8 peptide inhibitor Z-IETD.FMK (50 μM) abolished (percentage of FITC-Annexin V-positive cells, 3%) the effect of 4-AP on PS externalization (Fig. 6D). Pretreating Jurkat cells with the caspase-9 peptide inhibitor Z-LEHD.FMK (50 μM) (Fig. 6E) or the caspase-3 peptide inhibitor Ac-DMQD.CHO (50 μM) (Fig. 6F) resulted in similar inhibitory effects. The caspase-6 peptide inhibitor Z-VEID.FMK (50 μM) also prevented the effect of 4-AP on PS externalization (Fig. 6G). Cumulative data analysis showed significant inhibition of PS externalization by the various caspase inhibitors (Fig. 6H). In all these experiments, there was no staining of the cells with PI (Fig. 6).

3.6 4-AP-dependent time-course activation of caspases in Jurkat cells

Whereas data shown above established the involvement of caspases in the apoptotic effect of 4-AP, they did not provide informations on the kinetic of activation of the relevant caspases. To address this question, Jurkat cells were exposed to 4-AP and the selective activation of target caspases was followed as a function of time using caspase-specific fluorogenic substrates. Results showed that the basal level of caspase-8 activity was elevated at the onset of the assay and did not vary as a function of time (Fig. 7A). In marked contrast, after challenging the cells with 4-AP (5 mM), the activity of caspase-9 increased steadily following a time-lag period of 1 h (Fig. 7B). These observations were similar in the case of the activation of caspase-3 (Fig. 7C) and caspase-6 (Fig. 7D). The bulk of these results suggested that 4-AP did not activate the extrinsic pathway but triggered the intrinsic apoptosis pathway involving caspase-9 and caspase-3 and the activation of downstream caspase-6.

3.7 4-AP-induces the loss of $\Delta\Psi_m$

DiOC₆(3) is a membrane-permeable lipophilic cationic fluorochrome that can be employed to probe mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) [50] if used at concentrations in the nanomolar range [51]. The loss of $\Delta\Psi_m$ is a triggering signal of the intrinsic apoptosis pathway, resulting in the release of cytochrome c and the activation of caspase-9. We used DiOC₆(3) to assess $\Delta\Psi_m$ integrity in Jurkat lymphocytes challenged with 4-AP (5 mM). Results showed a marked decrease in DiOC₆(3) labeling (Fig. 8), indicating a loss of $\Delta\Psi_m$, that is an obligatory upstream event for cytochrome c release into the cytoplasm. These observations were interpreted to indicate that 4-AP-triggered apoptosis in Jurkat lymphocytes involves the intrinsic pathway.

4. Discussion

We present evidence that 4-AP activated the intrinsic apoptotic pathway that resulted in the death of Jurkat T lymphocytes. Evidence of 4-AP-induced apoptosis was based on the findings of the externalization of PS (Fig. 1) and the fragmentation of genomic DNA (Fig. 2). PI exclusion was consistent with the interpretation that 4-AP did not induce necrosis of Jurkat cells. Of significance, 4-AP also triggered the externalization of PS in peripheral blood lymphocytes (data not shown), suggesting that the effect of 4-AP was not restricted to the Jurkat T cell line.

The role of cytoplasmic Ca²⁺ in apoptosis remains controversial. Depletion of intracellular Ca²⁺ reserves, activation of I_{CRAC} and/or increases in [Ca²⁺]_i have been shown to prevent or to favor apoptosis [52]. For example, thapsigargin which triggers the release of Ca²⁺ from intracellular stores, causes Ca²⁺ overload of mitochondria, induction of the mitochondrial permeability transition pore and the swelling of the mitochondrial matrix in mast cells [53]. This cascade of events induces the rupture of the mitochondrial membrane and the release of cytochrome c [54]. In contrast, glucocorticoids have been shown to induce apoptosis of S49^{Neo} cells although glucocorticoids triggered only a modest increase in [Ca²⁺]_i, suggesting that a raise in [Ca²⁺]_i was not required for cell death [55]. In addition, studies done with Jurkat T cells exposed to thapsigargin have shown that an increase in [Ca²⁺]_i was ineffective in triggering apoptosis [56], whereas

opposite observations were made in the case of hepatoma HepG2 cells [39]. The rise in $[Ca^{2+}]_i$ triggered by 4-AP in the present investigation did not appear to be a determining event in 4-AP-induced apoptosis. First, the 4-AP-triggered rise in $[Ca^{2+}]_i$ returned to basal levels within 10 min (data not shown), suggesting that a sustained rise in $[Ca^{2+}]_i$ was not essential. Second, a sustained rise in $[Ca^{2+}]_i$ generated by exposure of Jurkat cells to mAb C305 did not result in an increase in the externalization of PS (Fig. 3A). Third, increasing $[Ca^{2+}]_i$ by exposing Jurkat cells to the Ca^{2+} ionophore ionomycin did not induce an increase in the externalization of PS (Fig. 3D). Fourth, it has been established that 4-AP triggers a non-capacitative Ca^{2+} entry in Jurkat cells [41], excluding the possibility of the participation of the endoplasmic reticulum reserves in mitochondrial Ca^{2+} overload which depends on the preservation of high Ca^{2+} microdomains at the mouth of endoplasmic reticulum Ca^{2+} release sites close to mitochondria [57].

4-AP is commonly used as a K^+ channel blocker and has been shown to block the Kv1.3 K^+ channel of Jurkat lymphocytes [58]. K^+ channels play an active role in apoptosis [59] since one of their properties is to regulate cell volume which is known to be an early event of apoptosis that precedes the characteristic ultrastructural or biochemical features [60]. As a corollary, blocking K^+ channels prevents structural and biochemical apoptotic events, although the protective effect may depend on cell types [52, 61]. Exposing Jurkat lymphocytes to TEA or CbTx, two pharmacological agents that block K^+ channel activity in these cells [58], failed to trigger the externalization of PS (Fig. 4), suggesting that 4-AP-triggered apoptosis of Jurkat cells was unlikely to be due to blockade of K^+ channels. Cytoplasmic alkalization may accompany apoptotic signals as observed in the case of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis [62]. However, activation of caspases by cytochrome c, a component of the intrinsic pathway of apoptosis [17], *in vitro* has been shown to be minimal at a neutral pH and maximal at acidic pH [46] in the case of Jurkat cells. Other studies have shown that intracellular acidification preceded and was essential for the release of cytochrome c in 293T cells and that *in vitro* assays at pH higher than 7.4 did not affect the activity of caspase-3 but suppressed the processing of its procaspase form [63]. Tafani et al. [64] have shown that staurosporine and TNF- α caused identical apoptotic events (translocation of Bax, cytochrome c release and death) in HeLa cells, although staurosporine induced an increase in pH_i , whereas TNF- α triggered a decrease in pH_i [64]. The contradictory effects of pH_i variations indicate a lack of correlation between pH_i and apoptosis. We (unpublished results) and others [40] have observed that 4-AP caused a rapid alkalization of Jurkat cells which is likely to inhibit the processing of procaspase-3. However, the increase in pH_i caused by 4-AP was not sustained over time and returned to basal levels (pH_i 7.1-7.2) within 20 min (data not shown) in the continued exposure of cells to 4-AP, excluding the possible effect of the rise in pH_i on 4-AP-dependent apoptosis. To obtain further evidence that an increase in pH_i did not mediate the 4-AP-dependent apoptotic effect, we exposed Jurkat cells to NH_4Cl , a condition that is known to increase pH_i [40]. Results showed that this cell treatment did not result in the externalization of PS (Fig. 4).

Taken individually, the previous data suggested that the blocking of Jurkat K^+ channels as well as the rises in $[Ca^{2+}]_i$ and pH_i did not appear to mediate the apoptotic effect of 4-AP in these cells. However, we could not formally exclude the possibility that a combination of these 4-AP-associated effects induced the process of apoptosis. This

possibility was addressed using a checkered approach. Results showed that a combination of increasing (ionomycin) $[Ca^{2+}]_i$ and blocking (CbTx) K^+ channels, increasing $[Ca^{2+}]_i$ and intracellular pH (NH_4Cl), increasing intracellular pH and blocking K^+ channels, or a combination of the three substances did not result in the induction of PS externalization in Jurkat cells (Fig. 5). These data were consistent with the interpretation that 4-AP-induced apoptosis of Jurkat cells was not the result of the reported effects of 4-AP on Jurkat cells.

A series of peptide inhibitors suggested that caspases were involved in the apoptotic effect of 4-AP in Jurkat cells. The pan-caspase inhibitor zVAD.FMK suppressed the externalization of PS, consistent with the involvement of caspases (Fig. 6C). Additional experiments showed that specific inhibitors of caspase-3, -6, -8 and -9 prevented the externalization of PS in 4-AP-exposed Jurkat cells (Fig. 6). To further assess the involvement of caspases, we used fluorometric assays to measure caspase activity following cell challenge with 4-AP. Results showed that the activity of caspase-3, -6 and -9 was up-regulated whereas the high basal level of activity of caspase-8 remained unchanged (Fig. 7). These results suggested that the intrinsic apoptosis pathway was activated by 4-AP but not the extrinsic pathway. The high basal level of caspase-8 activity (Fig. 7A) was unexpected since it was not reduced in the presence of peptide inhibitor and since this caspase is not activated in unstimulated Jurkat cells [65]. The level of activity may be related to the nature of the substrate used in the assay. It is to be noticed that a basal level of activity of caspase-8 higher than other caspases has been reported in the case of HL-60 cells [66] using the same peptide substrate as in the present study. Caspase-9 is activated upon the release of cytochrome c which is dependent on the loss of $\Delta\Psi_m$ [67]. Cytochrome c associates with Apaf-1 to form the apoptosome that initiates the intrinsic pathway of apoptosis. As expected, 4-AP triggered a loss of $\Delta\Psi_m$ in Jurkat cells (Fig. 8). The activation of caspase-9 and the loss of $\Delta\Psi_m$ were consistent with the interpretation that 4-AP triggers the intrinsic pathway of apoptosis in these cells.

The mechanism of cell death induced by 4-AP has not been fully elucidated, although a series of reports based on assays of DNA fragmentation, TUNEL fluorimetry, cell viability and proliferation [37, 39, 68] have provided strong evidence for the phenomenon. However, 4-AP has also been shown to have protective effects in the case of apoptosis induced by etoposide and dexamethasone in FDC-P1 murine myoblasts [69]. These data suggest that 4-AP may display opposite effects depending on cell type and may involve different molecular target(s), the nature of which remains to be elucidated.

Acknowledgments

We are indebted to Dr. Arthur Weiss for the gift of Jurkat cells. We thank Mr Patrick Giguère for constructive discussions and Miss Anick Nater for technical assistance. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research and the Center for Excellence Program of the University of Sherbrooke.

References

- [1] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Br J Cancer 1972;26:239-57.
- [2] Lockshin RA, Williams CM. J Insect Physiol 1965;11:123-33.

- [3] Zimmermann KC, Green DR. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:S99-103.
- [4] Cohen GM, Sun XM, Fearnhead H, MacFarlane M, Brown DG, Snowden RT, Dinsdale D. *J Immunol* 1994;153:507-16.
- [5] Wyllie AH. *Nature* 1980;284:555-6.
- [6] Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. *J Exp Med* 1995;182:1545-56.
- [7] Martin SJ, Green DR. *Cell* 1995;82:349-52.
- [8] Krebs J. *Biometals* 1998;11:375-82.
- [9] Matzinger P. *Science* 2002;296:301-5.
- [10] Rodenburg RJ, Raats JM, Pruijn GJ, van Venrooij WJ. *Bioessays* 2000;22:627-36.
- [11] Ravichandran KS. *Cell* 2003;113:817-20.
- [12] Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S. *Cell* 2003;113:717-30.
- [13] Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. *Nature* 2000;405:85-90.
- [14] Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. *Eur J Biochem* 1998;254:439-59.
- [15] Ashkenazi A, Dixit VM. *Science* 1998;281:1305-8.
- [16] Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. *ChemBioChem* 2001;2:20-9.
- [17] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:269-90.
- [18] Ly JD, Grubb DR, Lawen A. *Apoptosis* 2003;8:115-28.
- [19] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. *Cell* 1997;91:479-89.
- [20] Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. *Cell* 1996;86:147-57.
- [21] Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. *Free Radic Biol Med* 2001;31:697-703.
- [22] Kluck RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR, Newmeyer DD. *EMBO J* 1997;16:4639-49.
- [23] Bidère N, Senik A. *Apoptosis* 2001;6:371-5.
- [24] Nagata S. *Exp Cell Res* 2000;256:12-8.
- [25] Cryns V, Yuan J. *Genes Dev* 1998;12:1551-70.
- [26] Kolenko VM, Uzzo RG, Bukowski R, Finke JH. *Apoptosis* 2000;5:17-20.
- [27] Deas O, Dumont C, MacFarlane M, Rouleau M, Hebib C, Harper F, Hirsch F, Charpentier B, Cohen GM, Senik A. *J Immunol* 1998;161:3375-83.
- [28] Cahalan MD, Wulff H, Chandy KG. *J Clin Immunol* 2001;21:235-52.
- [29] DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD. *Nature* 1984;307:465-8.
- [30] Price M, Lee SC, Deutsch C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:10171-5.
- [31] Aussel C, Pelassy C, Mary D, Choquet D, Rossi B. *Immunopharmacology* 1990;20:97-103.
- [32] Schell SR, Nelson DJ, Fozzard HA, Fitch FW. *J Immunol* 1987;139:3224-30.
- [33] Sharma B. *Immunology* 1988;65:101-5.
- [34] Kirsch GE, Narahashi T. *J Pharmacol Exp Ther* 1983;226:174-9.
- [35] Choquet D, Korn H. *J Gen Physiol* 1992;99:217-40.
- [36] Yamane T, Furukawa T, Hiraoka M. *Am J Physiol* 1995;269:H556-64.

- [37] Chin LS, Park CC, Zitnay KM, Sinha M, DiPatri AJ, Jr., Perillan P, Simard JM. *J Neurosci Res* 1997;48:122-7.
- [38] Wang XQ, Xiao AY, Yang A, LaRose L, Wei L, Yu SP. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305:502-6.
- [39] Kim JA, Kang YS, Jung MW, Kang GH, Lee SH, Lee YS. *Pharmacology* 2000;60:74-81.
- [40] Guse AH, Roth E, Emmrich F. *Biochem J* 1994;301:83-8.
- [41] Barbar E, Rola-Pleszczynski M, Payet MD, Dupuis G. *Biochim Biophys Acta* 2003;1622:89-98.
- [42] Ahnadi CE, Payet MD, Dupuis G. *Cell Calcium* 1996;19:509-20.
- [43] Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. *Anal Biochem* 1994;218:314-9.
- [44] Gastman BR, Yin XM, Johnson DE, Wieckowski E, Wang GQ, Watkins SC, Rabinowich H. *Cancer Res* 2000;60:6811-7.
- [45] Liu C, Hermann TE. *J Biol Chem* 1978;253:5892-4.
- [46] Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC. *Nat Cell Biol* 2000;2:318-25.
- [47] Speake T, Elliott AC. *J Physiol* 1998;506 (Pt 2):415-30.
- [48] Ulmer JB, Donnelly JJ, Liu MA. *Eur J Immunol* 1994;24:1590-6.
- [49] Thornberry NA, Lazebnik Y. *Science* 1998;281:1312-6.
- [50] Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. *Cytometry* 1999;35:181-95.
- [51] Rottenberg H, Wu S. *Biochim Biophys Acta* 1998;1404:393-404.
- [52] Lang F, Ritter M, Gamper N, Huber S, Fillon S, Tanneur V, Lepple-Wienhues A, Szabo I, Gulbins E. *Cell Physiol Biochem* 2000;10:417-28.
- [53] Soboloff J, Berger SA. *J Biol Chem* 2002;277:13812-20.
- [54] Kuwana T, Newmeyer DD. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:691-9.
- [55] Bian X, Hughes FM, Jr., Huang Y, Cidlowski JA, Putney JW, Jr. *Am J Physiol* 1997;272:C1241-9.
- [56] Hampton MB, Vanags DM, Porn-Ares MI, Orrenius S. *FEBS Lett* 1996;399:277-82.
- [57] Szabadkai G, Simoni AM, Rizzuto R. *J Biol Chem* 2003;278:15153-61.
- [58] Martel J, Dupuis G, Deschenes P, Payet MD. *J Membr Biol* 1998;161:183-96.
- [59] Storey NM, Gomez-Angelats M, Bortner CD, Armstrong DL, Cidlowski JA. *J Biol Chem* 2003;278:33319-26.
- [60] Yu SP, Choi DW. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9360-2.
- [61] Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9487-92.
- [62] Lei HY, Tang MJ, Tsao N. *Apoptosis* 1997;2:304-12.
- [63] Segal MS, Beem E. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C1196-204.
- [64] Tafani M, Cohn JA, Karpnich NO, Rothman RJ, Russo MA, Farber JL. *J Biol Chem* 2002;277:49569-76.
- [65] Engels IH, Stepczynska A, Stroh C, Lauber K, Berg C, Schwenzer R, Wajant H, Janicke RU, Porter AG, Belka C, Gregor M, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. *Oncogene* 2000;19:4563-73.
- [66] Nagase M, Shiota T, Tsushima A, Murshedul Alam M, Fukuoka S, Yoshizawa T, Sakato N. *Immunol Lett* 2002;84:23-7.

- [67] Green DR, Reed JC. Science 1998;281:1309-12.
- [68] Ogata S, Inoue K, Iwata K, Okumura K, Taguchi H. Biosci Biotechnol Biochem 2001;65:2337-9.
- [69] Wang L, Zhou P, Craig RW, Lu L. J Membr Biol 1999;172:113-20.

LEGEND TO FIGURES

Fig. 1. 4-AP induces phosphatidylserine externalization in Jurkat T lymphocytes. The cells (5×10^6 lymphocytes/ml) were A) left untreated or, B) exposed to 4-AP (5 mM) for 3 h at 37°C. The cells were washed, labeled with FITC-Annexin V (Annexin V) and Propidium iodide (PI), and analyzed by flow cytometry. Data are representative of a minimum of three independent experiments.

Fig. 2. 4-AP induces DNA laddering in Jurkat T lymphocytes. The cells (2×10^6 lymphocytes/ml) were left untreated or were challenged with 4-AP (5 mM) for the indicated periods of time. They were washed, lysed as described in *Experimental Procedures* and their DNA content was isolated and resolved on a 1.2% TBE agarose gel, followed by detection under UV light using ethidium bromide staining.

Fig. 3. Increases in $[Ca^{2+}]_i$ does not induce the externalization PS in Jurkat T lymphocytes. A) Fura2-loaded Jurkat cells (5×10^6 lymphocytes/ml) bathing in a 1 mM Ca^{2+} -containing medium were challenged (indicated by the arrow) with an anti-TCR- β subunit-directed mAb (C305, 10 μ l of a 1:10 dilution of hybridoma) and changes in $[Ca^{2+}]_i$ were recorded as a function of time, at 37°C. In the other series of experiments, Jurkat cells (2×10^6 lymphocytes/ml) were maintained for 3 h at 37°C in Hepes-BSS buffer and were, B) left untreated, C) exposed to mAb C305 or, D) exposed to ionomycin (1 μ M). The cells were washed, labeled with FITC-Annexin V (Annexin V) and Propidium iodide (PI), washed and analyzed by flow cytometry. Data are representative of a minimum of three independent experiments.

Fig. 4. K^+ channel blockade and pH_i elevation do not cause the externalization of PS in Jurkat T lymphocytes. The cells (2×10^6 lymphocytes/ml) were maintained, in each set of experiments, in Hepes-BSS buffer for 3 h at 37°C. Jurkat cells were, A) left untreated or exposed to, B) TEA (5 mM), C) CbTx (100 nM) or, D) NH_4Cl (5 mM). The cells were washed, labeled with FITC-Annexin V (Annexin V) and Propidium iodide (PI), and analyzed by flow cytometry. Data are representative of a minimum of three independent experiments.

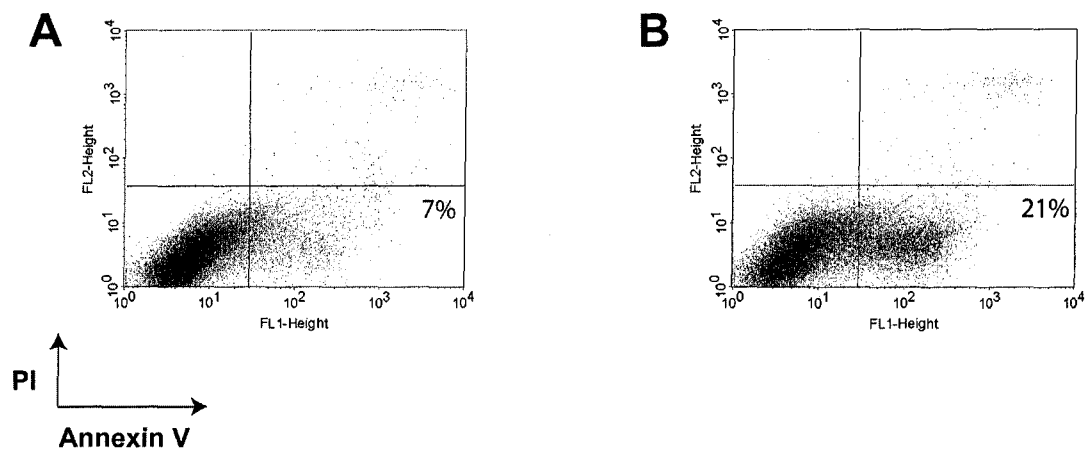
Fig. 5. A combination of K^+ channel blockade, calcium entry and pH_i elevation does not cause the externalization of PS in Jurkat T lymphocytes. Jurkat cells (5×10^6 lymphocytes/ml) were kept in a Hepes-BSS buffer for 3 h at 37°C. The cells A) were left untreated, or were exposed to, B) a combinations of ionomycin (1 μ M) and CbTx (100 nM), C) a combination of ionomycin (1 μ M) and NH_4Cl (5 mM), D) a combination of ionomycin (1 μ M) and NH_4Cl (5 mM), D) a combination of CbTx (100 nM) and NH_4Cl (5 mM) or, E) a combination of ionomycin (1 μ M), CbTx (100 nM) and NH_4Cl (5 mM). After the various challenges, the cells were washed, labeled with FITC-Annexin V (Annexin V) and Propidium iodide (PI), and analyzed by flow cytometry. Data are representative of a minimum of three independent experiments.

Fig. 6. Effects of caspase peptide inhibitors on 4-AP-induced externalization of PS in Jurkat T lymphocytes. The cells (2×10^6 lymphocytes/ml) were exposed for 1 h at 37°C

to A) and B) DMSO, C) pan-caspase inhibitor Z-VAD.FMK (50 μ M), D) caspase-8 inhibitor Z-IETD.FMK (50 μ M), E) caspase-9 inhibitor Z-LEHD.FMK (50 μ M), F) caspase-3 inhibitor Ac-DMQD.CHO (50 μ M) or, G) caspase-6 inhibitor Z-VEID.FMK (50 μ M). The lymphocytes were then challenged with 4-AP (5 mM) for 3 h at 37°C (B to F), washed and labeled with FITC-Annexin V (Annexin V) and Propidium iodide (PI), and analyzed by flow cytometry. Data are representative of a minimum of three independent experiments. H) Cumulative results of FITC-Annexin V-positive cells relative to DMSO-treated cells (controls). Data are shown as the mean \pm SD and are representative of at least three independent experiments. Statistical significance ($p < 0.05$) is indicated by an asterisk (*). Data are representative of a minimum of three independent experiments.

Fig. 7. 4-AP-dependent time-course activation of caspases in Jurkat T lymphocytes. The cells were exposed to DMSO (control) or to 4-AP (5 mM) at 37°C. Samples (2×10^6 cells) were taken at 30 min time intervals, centrifuged, resuspended in a hypotonic lysis buffer and kept at -80°C until lysed by freeze and thaw cycles. The cytoplasmic fraction was isolated by centrifugation and assayed for caspase activity using fluorogenic substrates and the absence (represented by the dotted lines)/presence (represented by the continuous lines) of caspase peptide inhibitors are described in *Experimental Procedures*. A) Time-dependent caspase-8 activity (using the substrate Z-IETD.AFC and the inhibitor Ac-IETD.CHO), B) caspase-9 activity (using the substrate Ac-LEHD.AFC and the inhibitor Ac-LEHD.CMK), C) caspase-3 activity (using the substrate Ac-DEVD.AFC and the inhibitor Ac-DMQD.CHO) and, D) caspase-6 activity (using the substrate Ac-VEID.AMC and the inhibitor Z-VEID.FMK). Results are expressed as relative fluorescence units (RFU) as a function of time. Data are representative of a minimum of three independent experiments.

Fig. 8. 4-AP causes the dissipation of mitochondrial membrane potential in Jurkat T lymphocytes. The cells (5×10^6 lymphocytes/ml) were A) left unstimulated or, B) exposed to 4-AP (5 mM) for 3 h at 37°C, washed and labeled with DiOC6(3) (40 nM) for 30 min at 37°C as described in *Experimental Procedures*. The cells were analysed by flow cytometry. Data are representative of a minimum of three independent experiments.

**Figure 1**

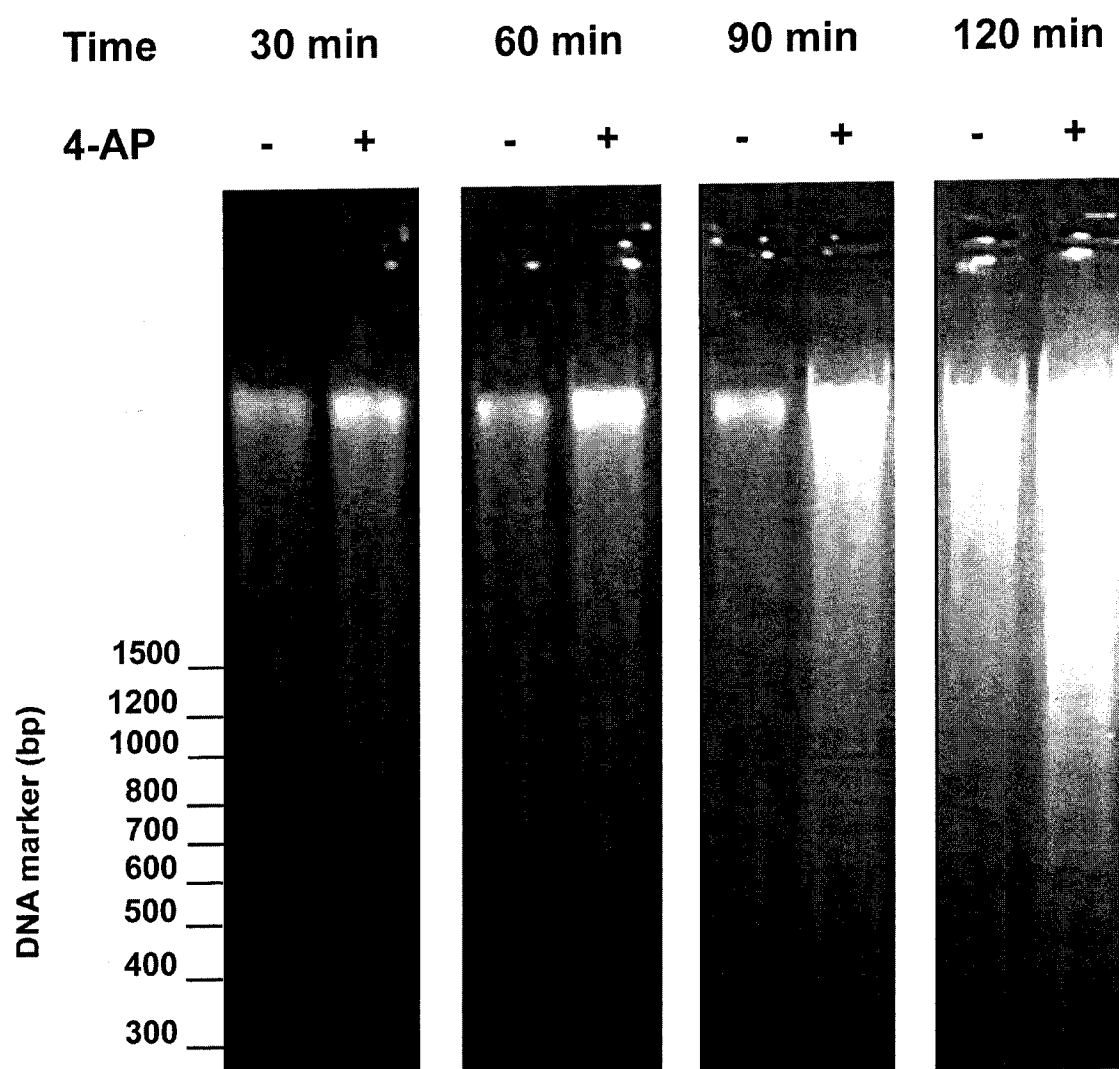


Figure 2

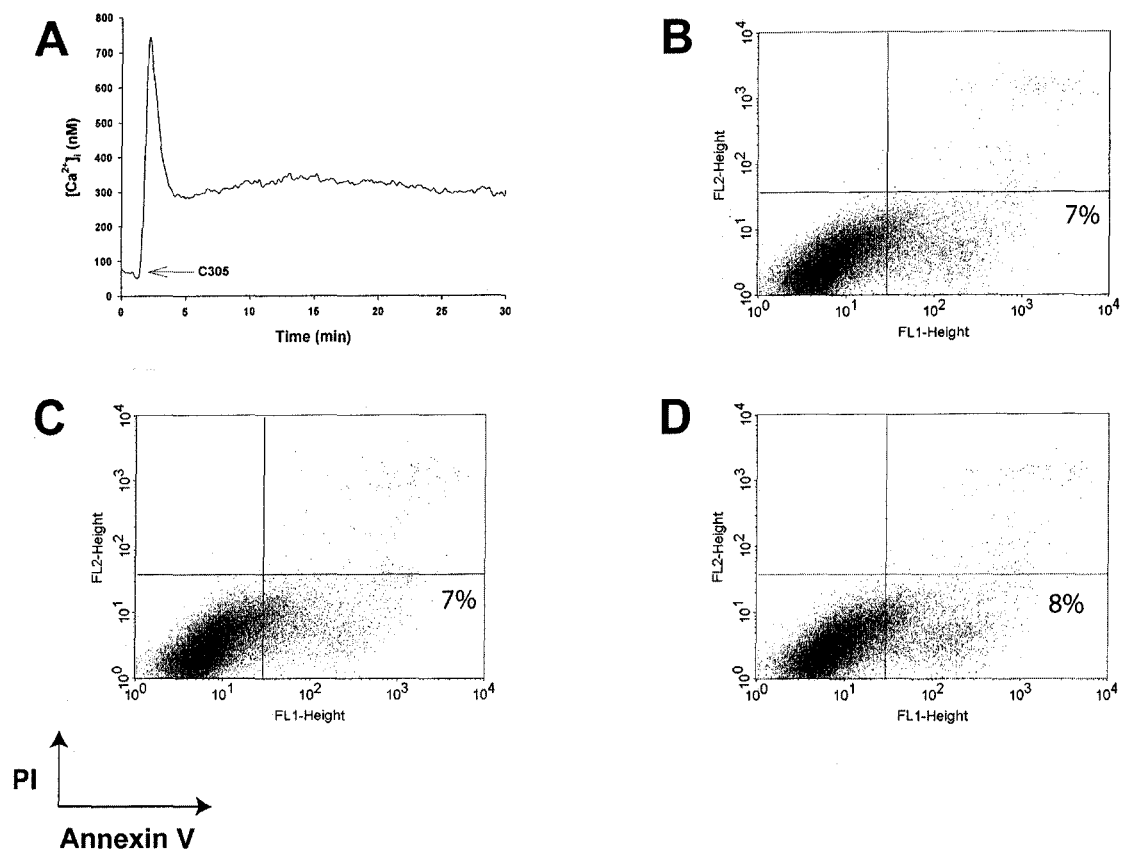
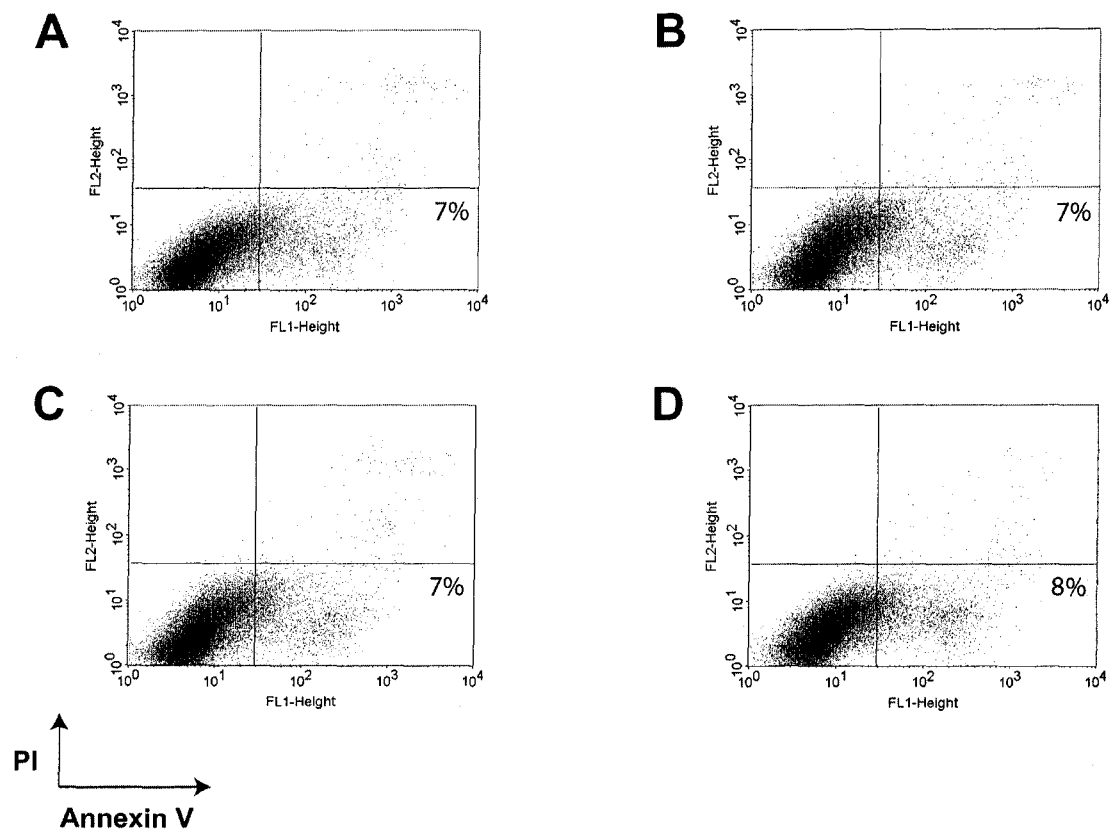


Figure 3

**Figure 4**

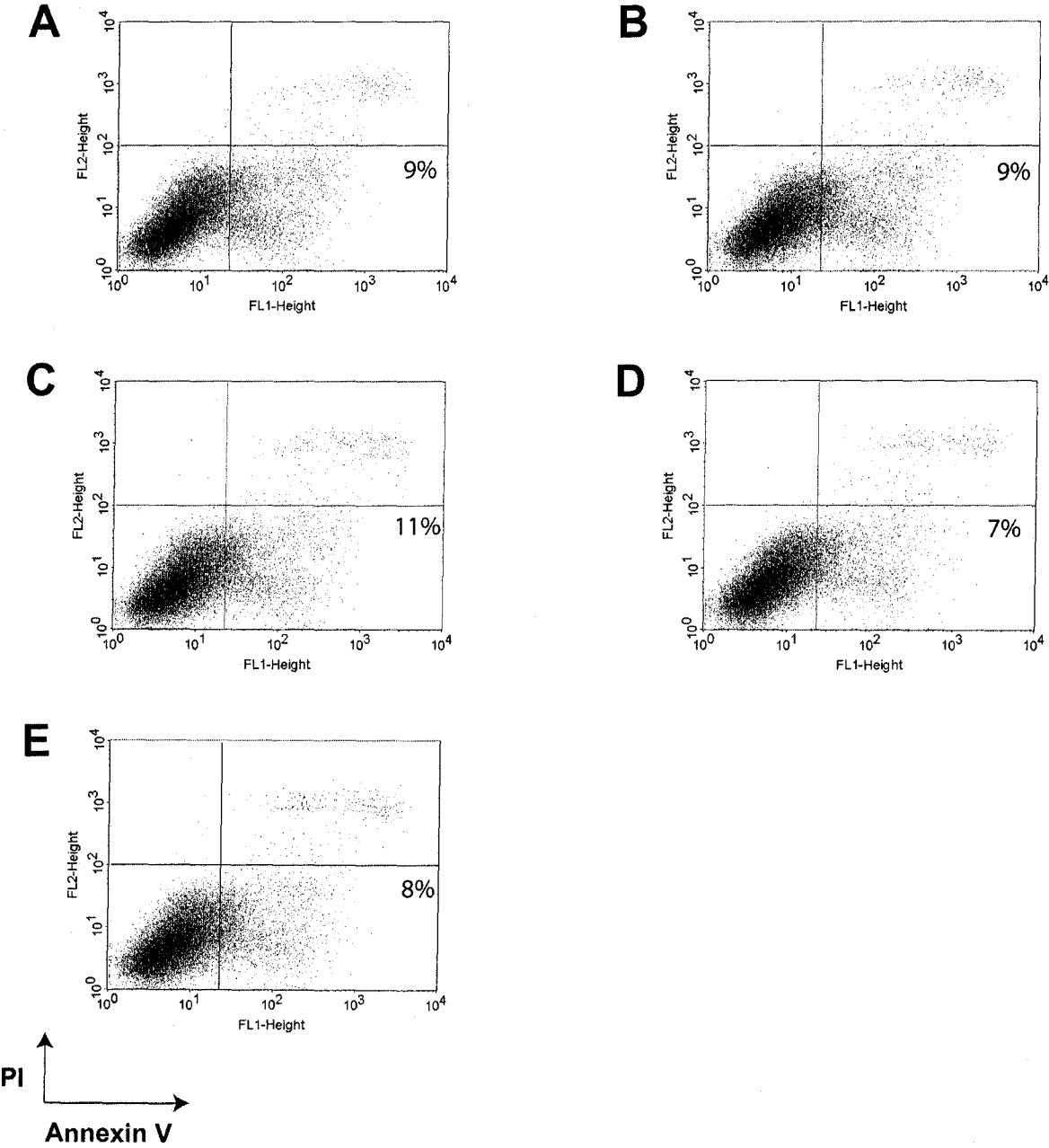


Figure 5

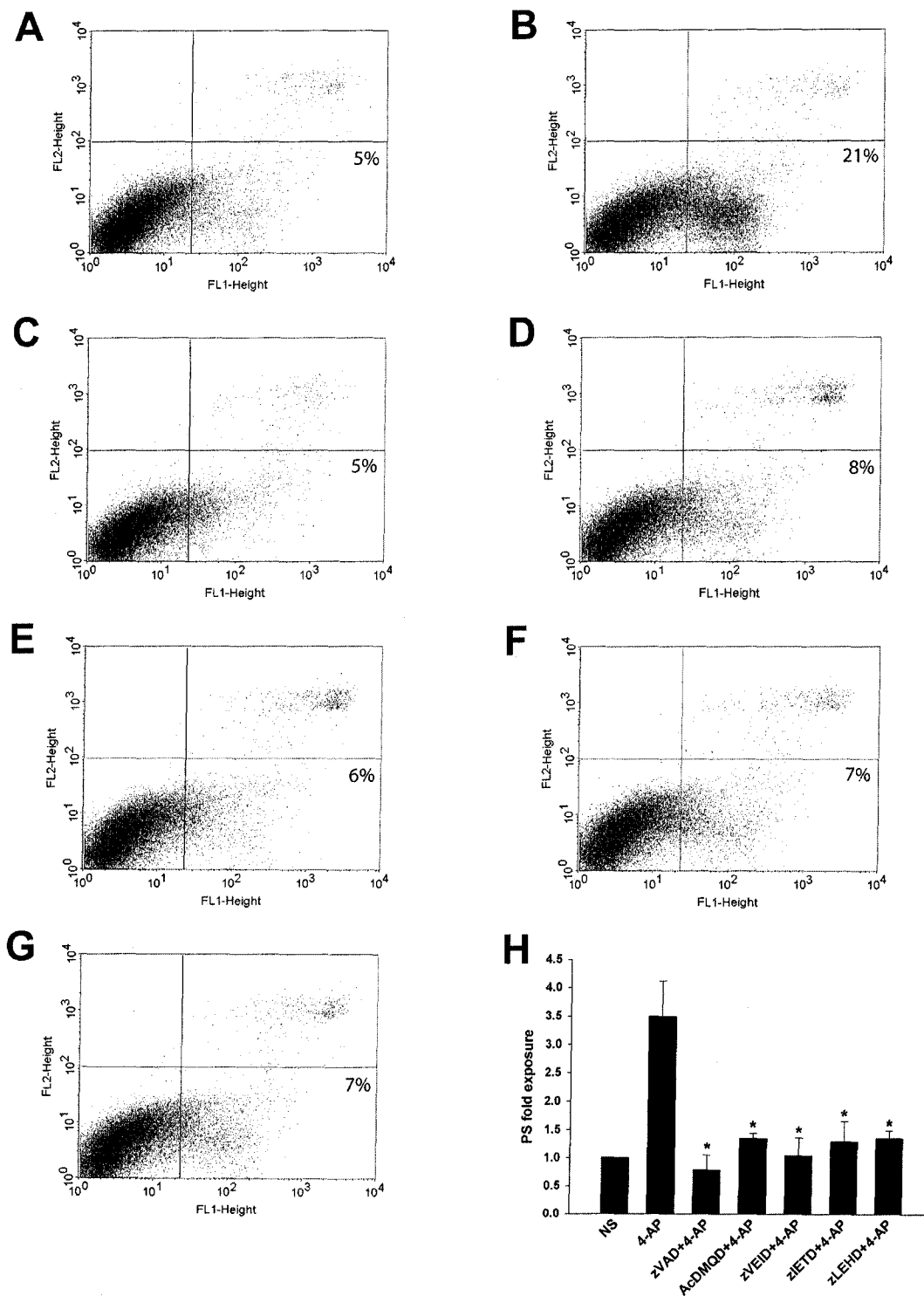


Figure 6

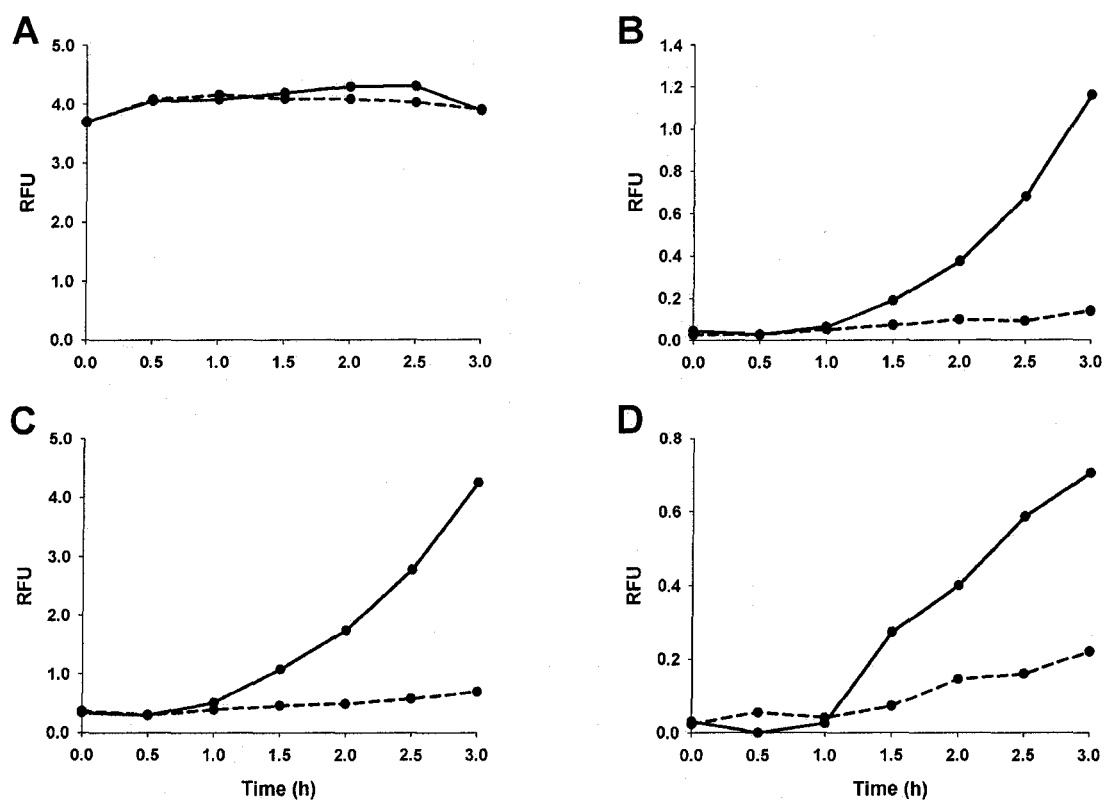
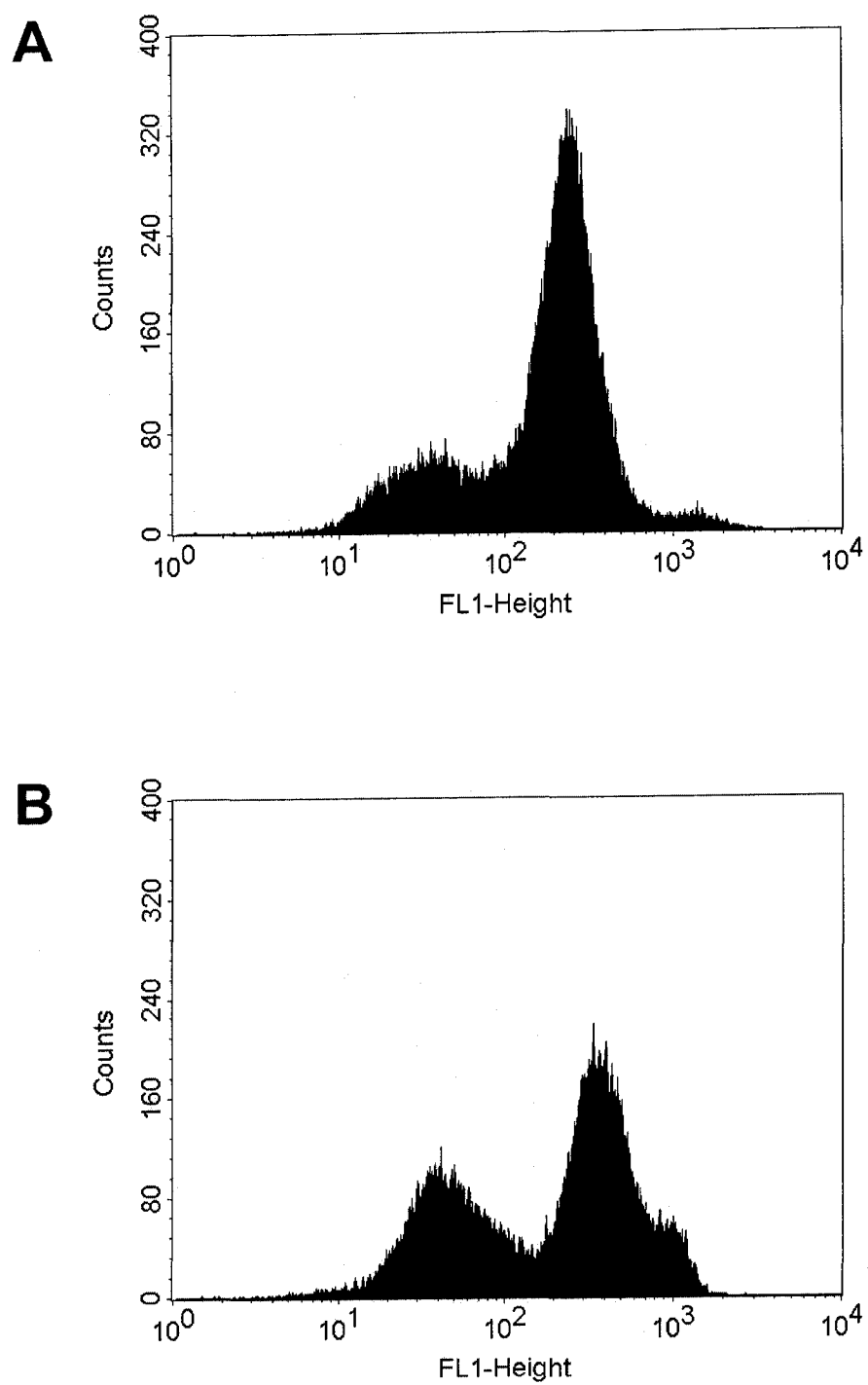


Figure 7

**Figure 8**

Manuscrit III

Barbar, É., Giguère, P., Bilodeau, L., Rola-Pleszczynski, M., Payet, M.D. et Dupuis, G. (2004) 4-Aminopyridine activates a cationic dye-permeation pore in Jurkat T lymphocytes which shares properties with the P2X₇ cytolytic pore. *Biochimica et Biophysica Acta*, article soumis pour publication.

Préambule

Ce manuscrit met en évidence la formation d'un pore ainsi que des blebs membranaires suite à une stimulation par la 4-AP chez le lymphocyte T Jurkat. Le pore possède des caractéristiques similaires à celles retrouvées suite à l'activation du P2X₇R. De plus, des expériences de transfection suggèrent une action directe ou indirecte (impliquant des composantes additionnelles) de la 4-AP sur le P2X₇R. J'ai réalisé les expériences décrites dans les figures 1 et 4 de ce manuscrit, ainsi que la répétition des expériences décrites aux figures 2 et 3.

8. Discussion

8.1 Régulation de l'influx calcique induit par la 4-AP

La 4-AP est un des bloqueurs de canaux K^+ les plus couramment utilisés et possédant un large spectre de sélectivité (KIRSCH *et al.*, 1986 ; KEHL et MCBURNEY, 1989). Cependant, cette sélectivité peut être remise en question, étant donné que la 4-AP peut aussi inhiber des courants Na^+ chez les cellules granulaires du cervelet de rat (MEI *et al.*, 2000). Outre son effet bloqueur des canaux K^+ , la 4-AP induit une entrée de calcium chez le lymphocyte T (GUSE *et al.*, 1994). Nous nous sommes intéressés à ce phénomène, à savoir quels éléments régulateurs pouvaient moduler cette réponse calcique chez le variant E6.1 du lymphocyte T Jurkat comme modèle expérimental.

Dans le manuscrit I, nous avons montré que la 4-AP induisait un influx de Ca^{2+} qui n'était pas déclenché par la vidange des réserves internes, donc une mobilisation de Ca^{2+} n'obéissant pas au modèle CCE. De plus, l'activation de la PKC réduisait considérablement l'influx de Ca^{2+} induit par la 4-AP (que nous abrévions par l'acronyme ICIA afin d'alléger le texte). L'ICIA était également réduit suite à une inhibition de la S/T PPase PP1. Une combinaison de l'activation de PKC avec une inhibition de PP1 avait un effet additif sur le blocage de l'ICIA, ce qui suggérerait que les éléments impliqués dans l'ICIA étaient fortement inhibés par une hyperphosphorylation. Cette sensibilité à la PKC et à la PP1 suggère que l'ICIA est régulable par ces enzymes soit par une action directe sur la cible(s) de la 4-AP, ou par une médiation via des protéines associées.

8.2 Effet de PKC et de PP1

Chez les cellules Jurkat au repos, les isoformes α et β de PKC sont majoritairement cytoplasmiques tandis qu'une grande fraction des isoformes δ et ϵ sont membranaires comparativement aux isoformes α et β (TSUTSUMI *et al.*, 1993). Cela suggère que les PKC possèdent une activité basale au repos. De plus, selon la fiche technique de Sigma-Aldrich, le bisindolmaléimide GF 109203X inhibe toutes les isoformes de PKC, à l'exception de PKC δ et des PKC atypiques. Sachant que PKC δ se retrouve à la membrane plasmique au repos (TSUTSUMI *et al.*, 1993), donc ayant possiblement une activité basale, il est concevable que cette dernière ait contribué et compensé dans le maintien de l'équilibre calcique, même en présence du GF 109203X, d'où l'absence de modulation de l'ICIA en présence de ce composé. Une étude approfondie des isoformes impliqués dans l'ICIA sera cruciale pour éclaircir ce point.

Mais, le fait que le GF 109203X pouvait récupérer l'ICIA en abolissant l'effet de l'OAG est un indicateur que les PKC étaient bel et bien responsables de la modulation de l'ICIA. Dans ce cas-là, il est possible que les PKC ne soient pas impliquées dans l'homéostasie basale du Ca^{2+} , même si certaines isoformes sont transloquées basalement à la membrane plasmique, ce qui explique l'incapacité du GF 109203X à augmenter l'ICIA.

Néanmoins, dans l'éventualité où l'activité basale des PKC ne participe dans la mobilisation calcique, il devient concevable que d'autres protéines kinases aient un rôle à jouer dans l'ICIA. Au fait, étant donné que la calyculine A seule avait un effet réducteur sur l'ICIA, cela suppose que la PKC et la PP1 pourraient agir sur des cibles différentes ou

via des mécanismes différents, mais dont l'effet concomittant est la réduction de l'entrée de Ca^{2+} .

8.3 Cible calcique de la 4-AP : CRAC ou TRP ?

La PMA est apte à bloquer la mobilisation calcique induite par la liaison du CD3 (contexte CCE) chez les lymphocytes Jurkat (TORDAI *et al.*, 1989 ; NORDSTROM *et al.*, 1990 ; SARKADI *et al.*, 1990), sans toutefois affecter la production d'InsP3 chez ces cellules (GUSE *et al.*, 1994) ou chez les cellules T HPB-ALL (SHIVNAN et ALEXANDER, 1995). Ces résultats suggèrent, en conjonction avec nos travaux, que la 4-AP agit sur des canaux Ca^{2+} ou des facteurs impliqués dans l'influx de Ca^{2+} , d'une manière sensible à l'activation de PKC. Nos résultats indiquent que l'ICIA possède des éléments communs avec le CCE, possiblement le canal CRAC ou les candidats proposés du CRAC, comme le CaT1 (TRPV6) ou les TRP. Au fait, l'activation de PKC par le phorbol ester réduit le courant CRAC et l'entrée de Ca^{2+} chez les cellules de leucémie basophile de rat RBL-2H3 (PAREKH et PENNER, 1995) et chez la microglie de rat (HAHN *et al.*, 2000). Ainsi, la modulation du CRAC par la PKC pourrait suggérer une implication potentielle de ce canal dans l'ICIA.

Dans le cas des TRP canoniques (TRPC) de mammifères, on a démontré, chez des cellules HEK293 et des cellules B DT40 transfectées, que l'activation de PKC inhibait l'activation du TRPC4 ou du TRPC5, mais pas du TRPC3 (VENKATACHALAM *et al.*, 2003). Cette activation était indépendante de l'InsP3 ou des réserves de Ca^{2+} , quoique les analogues du DAG pouvaient activer le TRPC3 sans nécessairement activer la PKC (VENKATACHALAM *et al.*, 2003). Ces observations indiquent une modulation différentielle des TRP par la PKC. Cet argument pourrait s'appliquer dans le cas de la 4-

AP, et ouvre une perspective dans l'étude des TRP et de leur sensibilité à la 4-AP. Enfin, la participation des pompes PMCA est à considérer, car la PKC module le Ca^{2+} cytosolique libre en stimulant l'activité des PMCA, ce qui a pour effet de réduire la charge intracellulaire en calcium (BALASUBRAMANYAM et GARDNER, 1995).

Nous avons quelques évidences de l'implication du CRAC ou des TRP dans l'ICIA, illustrées par des bloqueurs classiques de ces canaux, tel que l'éconazole, le SKF 96365 et la capsaïcine (résultats non-publiés), ce qui indique une possibilité d'action diverse de la 4-AP sur ces cibles induisant un influx de calcium. Cependant, tous les bloqueurs du canal CRAC décrits jusqu'à présent, tel que le SKF-96365 et l'éconazole (FRANZIUS *et al.*, 1994), le 2-aminoéthylidiphényl borate (2-APB) (PRAKRIYA et LEWIS, 2001) et la capsaïcine (FISCHER *et al.*, 2001) possèdent un IC_{50} dans l'ordre du micromolaire et ne sont donc pas spécifiques. Par exemple, le 2-APB active et sensibilise le TRPV3, avec un EC_{50} de 28 μM (CHUNG *et al.*, 2004), ce qui indique qu'il faut utiliser ces agents bloqueurs avec prudence. Par contre, on a rapporté récemment un effet inhibiteur du CRAC par des dérivés pyrazole (IC_{50} dans l'ordre du nanomolaire), dont le plus efficace est le BTP2 (ou YM-58483) (ISHIKAWA *et al.*, 2003 ; ZITT *et al.*, 2004). Ces composés ne sont pas encore disponibles commercialement, mais ils seront des outils ultérieurs dans la caractérisation de l'ICIA.

8.4 Mort cellulaire par la 4-AP

Une autre caractéristique de la 4-AP est son affectation de la viabilité de quelques types cellulaires. Cependant, aucun mécanisme détaillé n'a été avancé pour décrire la mort cellulaire engendrée par la 4-AP, souvent citée comme apoptotique. Nous nous sommes penchés sur cette question et avons étudié l'activation des voies apoptotiques

chez les cellules Jurkat exposées à la 4-AP. Le manuscrit II décrit les résultats qui montrent que la 4-AP induit une externalisation de PS et une fragmentation de l'ADN, deux indices d'une mort cellulaire par apoptose. Nos résultats montrent également que la 4-AP induit une activation d'une cascade de caspases, soit la caspase-9 (initiatrice) et les caspases -3 et -6 (exécutrices). De plus, nous avons observé une perte de $\Delta\Psi_m$, soit un événement précédant la relâche du cytochrome c, qui conduit à la formation de l'apoptosome par le biais de l'activation de la caspase-9. Ces résultats sont caractéristiques d'une mort cellulaire par apoptose par l'intermédiaire de l'activation de la voie intrinsèque (ou mitochondriale). Soulignons que cette voie apoptotique est, pour l'instant, propre aux cellules Jurkat, et reste à démontrer dans les autres lignées ou types cellulaires soumis à un traitement à la 4-AP.

8.5 Pores de perméabilité mitochondriale

Un élément dans l'apoptose n'a pas été abordé, soit la participation des protéines Bcl-2, en particulier les protéines cytoplasmiques pro-apoptotiques Bax et Bid. La protéine Bid est clivée par la caspase-8 et le granzyme B. Une fois tronquée (tBid), elle transloque à la mitochondrie, s'insère dans la membrane mitochondriale externe où elle induit un changement conformationnel de Bak suivi d'une homo-oligomérisation de ce dernier (ESPOSTI, 2002). Ainsi, un pore est formé et permet la relâche du cytochrome c. Quant à la protéine Bax, lorsqu'elle se dissocie de son régulateur négatif 14-3-3, d'une manière dépendante ou indépendante des caspases, elle transloque également à la mitochondrie. L'interaction de Bax avec tBid stimule un changement conformationnel de Bax, suivi de son insertion dans la membrane mitochondriale externe, puis de son assemblage en tétramère. Il en résulte un pore perméable au cytochrome c (DONOVAN

et COTTER, 2004). Les pores Bak et Bax sont tous les deux bloquables par Bcl-2. Dans le contexte de 4-AP, il est possible que ces pores contribuent à la relâche du cytochrome c engendrée par la perte $\Delta\Psi_m$, tel que démontré dans le manuscrit II. Une étude des protéines de la famille Bcl-2 amènera ainsi une meilleure compréhension de l'apoptose induite par la 4-AP.

8.6 Fusion cellulaire et formation de pore

Décollant des observations morphologiques obtenus par stimulation des cellules Jurkat avec la 4-AP, tel que l'apparition de blebs et la fusion cellulaire, nous nous sommes attardés à un des récepteurs membranaires responsables de tels phénomènes, soit le P2X₇R. Outre les blebs et la fusion cellulaire décrites dans le manuscrit III, nous avons remarqué une restriction quant à l'entrée de cations de taille importante. Les cellules traitées à la 4-AP deviennent permissives au cation éthidium (314 Da), mais pas au cation propidium (414 Da). Une telle restriction est propre aux cellules Jurkat et médiée par le P2X₇R, selon la littérature.

Aussi, nous avons montré que cette restriction de perméation pouvait être mise en évidence chez des cellules CHO-K1 transfectées avec le P2X₇R de rat mais pas chez les cellules COS-7 et HEK 293 transfectées avec l'ADNc encodant le P2X₇R. Nous avons utilisé le P2X₇R du rat suite à la recommandation de Dre Annmarie Surprenant, sachant que le récepteur du rat se transfecte mieux celui de l'humain. Enfin, des expériences d'électrophysiologie (*patch clamp*) effectuées par le laboratoire du Dr Marcel D. Payet ont montré une induction d'un courant cationique entrant non-sélectif et non-rectifiant suite à la stimulation de cellules Jurkat avec la 4-AP (non publié). Ce courant était similaire à celui enregistré suite à une stimulation des cellules avec le BzATP. Nous

n'avons pas effectué des expériences d'électrophysiologie chez des cellules transfectées avec le P2X₇R. Ces résultats indiquent que la 4-AP pourrait agir directement sur le P2X₇R (transfectants CHO), ou indirectement via des protéines associées, étant donné l'échec d'induire une entrée d'éthidium chez les cellules COS et HEK 293 transfectées, et sachant qu'on a rapporté l'interaction du P2X₇R de rat avec plus d'onze protéines chez les cellules HEK 293 (KIM *et al.*, 2001). Ainsi, la formation de pore induite par la 4-AP suggère que le P2X₇R posséderait des sensibilités différentes à la 4-AP, et ce dépendamment du type cellulaire et des protéines accessoires disponibles.

Les CGM (cellules géantes multinucléées) sont issues de la fusion de deux ou plusieurs macrophages (CHAMBERS, 1978) et apparaissent communément à des sites d'inflammation granulomateuse. Ce phénomène de fusion est connu *in vitro* chez plusieurs types cellulaires comme les macrophages, les monocytes, les lignées de cellules T (ANDERSON, 2000), mais la base physiologique de la formation des CGM n'est pas connue. La formation spontanée de CGM, bloquable par l'ATP oxydé, a été rapportée chez les macrophages murins exprimant de hauts niveaux de P2X₇R (CHIOZZI *et al.*, 1997). De plus, le blocage du P2X₇R empêche la formation de CGM chez les ostéoclastes (GARTLAND *et al.*, 2003) et les macrophages murins (FALZONI *et al.*, 2000) *in vitro*. Il pourrait donc avoir un lien entre la formation de CGM par le P2X₇R et celle observée suite à un stimulus de 4-AP.

8.7 Effet de 4-AP chez les lymphocytes périphériques

Récemment, une étude portant sur l'effet de la 4-AP sur les lymphocytes périphériques humains (PBL) a été publiée (LAJDOVA *et al.*, 2004). Dans ce travail, on a rapporté les profils calciques induits par la 4-AP chez les PBL. Ces profils sont

similaires à ce que nous avons obtenu chez les cellules Jurkat, notamment à ce qui a trait à l'entrée non-capacitative de Ca^{2+} . De plus, les auteurs ont avancé l'implication du $\text{P2X}_7\text{R}$ dans l'ICIA, et ce par l'usage d'inhibiteurs du récepteur tel que le BBG et le KN-62, ainsi que par la restriction du pore pour l'entrée d'éthidium et non du propidium. Cependant, ces expériences constituent une approche indirecte en comparaison à notre approche expérimentale de transfections. Au fait, nos expériences avec les transfectants du $\text{P2X}_7\text{R}$ nous ont incité à être prudent dans l'interprétation des résultats. D'une part, la stimulation des cellules par la 4-AP exhibe un comportement similaire à celui obtenu par l'activation du $\text{P2X}_7\text{R}$, cet effet était sensible au BBG et au KN-62 (non-publié), mais l'inhibition par ces agents n'était pas très forte, soit de l'ordre de 20-30%, en ce qui a trait à l'entrée de Ca^{2+} , ce qui suppose que d'autres canaux ioniques sont impliqués. Par contre, l'entrée d'éthidium démontre qu'un pore de grande taille est formé, surtout dans le cas des transfections de cellules CHO. Nous n'avons pas utilisé d'inhibiteurs du $\text{P2X}_7\text{R}$ dans ce contexte, alors il s'agit d'un élément à développer.

8.8 4-AP et sclérose en plaques : Mécanismes cliniques

La sclérose en plaques est une maladie autoimmune découlant d'une démyélinisation inflammatoire dans le système nerveux central (SNC). On présume que l'apoptose joue un rôle dans l'immunorégulation via la mort cellulaire des cellules T induite par leur activation (*activation-induced T-cell death, AICD*) (ZIPP, 2000). Comme dans l'EAE, la majorité des cellules T autoréactives sont CD4^+ et consistent en cellules T *helper-1* (Th1) et T *helper-2* (Th2). Les Th1 sont majoritaires, stimulent les macrophages et peuvent détruire directement ou causer des dommages aux cellules cibles. Parmi les cytokines produites par les Th1, on retrouve le $\text{TNF-}\alpha$, $\text{TNF-}\beta$ et l'interféron- γ (IFN- γ),

tous présents dans les plaques sclérotiques. L'IFN- γ et le TNF- α peuvent réguler à la hausse les molécules du CMH classe II et les molécules d'adhésion, permettant ainsi aux cellules T d'interagir avec l'endothélium à la barrière hémato-encéphalique et avec les cellules présentatrices d'antigènes, comme la microglie et les astrocytes dans le parenchyme. Bien que la sclérose en plaques soit considérée comme maladie autoimmune médiée par les cellules T, des autoanticorps augmentant le processus de démyélinisation ainsi que la production intrathécale d'immunoglobulin G chez les patients, indiquant une réponse humorale aberrante dans la cette maladie (ZIPP, 2000). Supposément, les Th2 induisent la production d'anticorps d'une part, et régulent l'inflammation via les cytokines, tel que l'IL-4 et l'IL-10 d'une autre part. Un autre mécanisme régulateur de l'inflammation est l'apoptose. En effet, dans la phase de régression de l'EAE, une apoptose massive est observée dans le cerveau, indiquant une mort de cellules T, limitant ainsi le dommage (SCHMIED *et al.*, 1993).

Ainsi, il est plausible de penser que la 4-AP puisse accélérer le processus d'apoptose dans le SNC. Par son excellente capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique, la 4-AP pourrait non seulement atteindre les neurones et améliorer la transmission de l'influx nerveux, mais également accélérer l'apoptose des cellules T autoréactives. Évidemment, le manque de spécificité de la 4-AP n'exclut pas un effet apoptotique chez les autres cellules inflammatoires ou nerveuses. Or, la 4-AP antagonise la pompe ATPase Na⁺/K⁺ et induit une mort hybride (apoptose et nécrose simultanément) chez les neurones corticaux murins en culture, après 48 h de stimulation (WANG *et al.*, 2003). Malgré cette toxicité neuronale, le travail de Wang *et al.* pourrait indiquer une sensibilité moindre des neurones à la 4-AP, en comparaison aux cellules T Jurkat

(apoptose déclenchée en moins de 2 h), tel que nous l'avons démontré dans le manuscrit II. Par conséquent, si la 4-AP a bel et bien un effet apoptotique dans le SNC *in vivo*, cet effet affectera vraisemblablement les PBL plus que les cellules neuronales. Cette mort cellulaire peut être causée par l'action du P2X₇R, étant donné l'abondance de ce récepteur dans le SNC et les cellules immunitaires.

8.9 Cytolyse versus apoptose

La cytolysse est une caractéristique connue du P2X₇R (DI VIRGILIO *et al.*, 1998) et nous l'avons observé après environ 20 min de stimulation à la 4-AP chez les cellules Jurkat (non publié). Au fait, cela amène un point important quant à l'interprétation des résultats illustrés dans le manuscrit II. Nous avons caractérisé l'apoptose après 2-3 h de stimulation à la 4-AP, ce qui ne tient pas compte des cellules cytolysées après 20 min de stimulation, étant donné que ces dernières ne peuvent pas être détectées, en plus que les débris cellulaires ont été exclus des acquisitions et des analyses de cytométrie de flux. Alors, il est possible que la mort cellulaire induite par la 4-AP soit biphasique, c'est-à-dire que les cellules sensibles, ou endommagées, soient éliminées en premier par un mécanisme de cytolysse, tandis que les cellules plus résistantes, ou non-endommagées, soient éliminées tardivement par apoptose, tel que démontré dans le manuscrit II.

Quant à l'implication de l'ICIA dans l'apoptose, il s'agit d'une question importante, mais contradictoire. D'une part, une augmentation incontrôlée du calcium intracellulaire est connue pour causer la mort cellulaire. La 4-AP induit effectivement un influx calcique, mais ce dernier est transitoire (contrôlé) et diminue graduellement pendant 30 min (non publié), contrairement à une stimulation du TCR dont la signalisation calcique peut durer plus de 2 h sans causer de l'apoptose. De plus, un

argument supplémentaire est illustré par la 3,4-DAP. Cette molécule possède plusieurs propriétés avec la 4-AP, tel que la structure, le blocage de canaux K^+ , l'induction d'une élévation du pH intracellulaire (pH_i), l'externalisation de PS et la fragmentation de l'ADN chez la cellule. Cependant la 3,4-DAP n'induit aucune mobilisation de Ca^{2+} (manuscrit soumis à *FEBS Letters*, juillet 2004), suggérant que le Ca^{2+} ne semble pas être l'élément déclencheur de l'apoptose par la 4-AP.

Néanmoins, la PKC peut réguler l'apoptose (BRODIE et BLUMBERG, 2003 ; GUTCHER *et al.*, 2003). Par exemple, la PKC δ est non seulement activée lors d'un stimulus apoptotique (TNF- α , Fas-L, étoposide, H_2O_2 , radiation ionisante ou UV), mais l'inhibition l'activité de PKC δ abolit l'apoptose engendrée par les divers stimuli cités (BRODIE et BLUMBERG, 2003). Or, la PKC δ peut être anti-apoptotique chez le neutrophile traité au TNF- α , et cet effet est bloquable avec la rottlerine (KILPATRICK *et al.*, 2002). En général, avec quelques exceptions, la majorité des évidences indiquent que PKC α , PKC β , PKC ϵ et les isoformes atypiques sont anti-apoptotiques, tandis que les isoformes δ et θ sont pro-apoptotiques (GUTCHER *et al.*, 2003). L'ICIA se dissipe graduellement après 30 min de stimulation (non publié). Par conséquent, il serait intéressant de déterminer si les PKC sont réellement activées lors d'une stimulation avec la 4-AP et si elles sont responsables de l'atténuation graduelle de l'ICIA. L'activation de PKC avec le phorbol ester supprime l'apoptose induite par le TRAIL chez les cellules Jurkat (GUO et XU, 2001 ; SARKER *et al.*, 2001). Donc, la modulation de l'apoptose par la PKC dépend du stimulus apoptotique et de la balance de l'activation des différentes isoformes de PKC, pro- et anti-apoptotiques.

Alors, des essais d'activité kinase, de translocation membranaire et l'emploi d'inhibiteurs spécifiques aux isoformes de PKC seraient des outils pour répondre à cette hypothèse.

8.10 4-AP et immunosuppression

Chez les patients atteints d'une blessure chronique et incomplète de la moëlle épinière, la 4-AP administrée par voie orale (nom commercial Fampridine™) à raison de 12-25 mg par dose, deux fois par jour, est absorbée lentement (concentration plasmatique maximale après 2.6-3.7 h), éliminée (demi-vie plasmatique de 5.6-7.6 h) puis atteint un niveau stable après 4 jours d'administration (HAYES *et al.*, 2003). De plus, la Fampridine™ est bien tolérée à des doses plus élevées (25-60 mg, deux fois par jour), mais avec quelques effets secondaires (par ordre d'importance) : étourdissement, infection de la voie urinaire, paresthésie, ataxie et insomnie (HAYES *et al.*, 2004).

À noter que dans presque toutes les expériences *in vitro* faites avec la 4-AP, cette dernière est utilisée à une concentration moyenne de 5 mM. Cela dépasse grandement les doses orales administrées à des patients atteints de blessure de la moëlle épinière, soit de 20-60 mg par dose, et correspondant à des concentrations plasmatiques maximales moyennes (C_{max}) de 60-140 ng/ml, soit 0.6-1.5 μ M (HAYES *et al.*, 2004). Malgré cette faible concentration plasmatique, la 4-AP semblait induire une certaine immunosuppression, étant donné l'occurrence d'infections urinaires chez plusieurs patients traités à la Fampridine™. Cependant, dans étude clinique chez certains patients atteints de sclérose en plaques, on a observé des effets secondaires plus marquants à des concentrations plasmatiques de 4-AP dépassant 100 ng/ml (1 μ M), soit de l'épilepsie et de la confusion aigüe (BEVER *et al.*, 1994). Ainsi, la posologie de la Fampridine™ est

importante, dépendamment des maladies traitées. Dans une expérience effectuée sur des PBL, la fragmentation de l'ADN induite par la 4-AP était concentration-dépendante et débutait à 1 mM (non publié), ce qui appuie l'hypothèse que la 4-AP puisse induire une apoptose chez des cellules périphériques, et possiblement *in vivo*. À ma connaissance, il n'y a pas eu d'études *in vivo* portant sur l'effet apoptotique de la 4-AP. Par conséquent, des expériences sur le modèle murin d'EAE, par exemple, pourraient être effectuées, comme la quantification de l'apoptose des cellules T infiltrant le CNS.

8.11 Perspectives concernant les cellules T Jurkat

En résumé, mes travaux ont contribué à décrire les mécanismes d'action de la 4-AP chez le lymphocyte T humain Jurkat. Ainsi, dans une optique d'intégration des résultats obtenus, nous pourrions énoncer un mécanisme quant à l'apoptose induite par la 4-AP. Il est possible que la 4-AP agisse sur le P2X₇R et induise de l'apoptose, car ce récepteur est connu pour causer la mort cellulaire (cytolyse). Cependant, le mécanisme exact (voie apoptotique, caspases) par lequel le P2X₇R cause la mort cellulaire n'a pas encore été détaillé. Nous pourrions spéculer et proposer que la voie intrinsèque soit activée, étant donné que le P2X₇R n'est pas un récepteur de type I membranaire, comme tous les récepteurs de mort cellulaire (e.g. Fas, TNFR). Toutefois, le domaine cytoplasmique du P2X₇R contient un domaine de mort apparenté au TNFR (*TNFR-related death domain*) (ADRIOUCH *et al.*, 2002) qui pourrait alors être responsable de la mort cellulaire. Si ce domaine est apte à activer la caspase-8, par exemple, que Bid sera potentiellement le lien manquant entre l'activation du P2X₇R et l'induction de la cascade intrinsèque de l'apoptose, ce qui concorderait avec la logique du mécanisme apoptotique que nous avons décrit pour la 4-AP.

La fonction de l'ICIA demeure inconnue. Vraisemblablement que l'ICIA ne soit pas impliqué dans l'apoptose causée par la 4-AP (manuscrit II), donc l'impact physiologique de cet événement reste à déterminer, vu que peu de travaux ont été effectuées sur ce sujet. Quant à la régulation de l'ICIA par la PKC et la phosphatase PP1, il se peut que le P2X₇R contribue en partie à l'influx de calcium (possiblement en conjonction avec les TRP ou le CRAC) et qu'il soit régulé par la PKC et PP1.

Un des rôles du P2X₇R dans la signalisation cellulaire est illustré par une activation de la phospholipase D d'une manière dépendante ou indépendante de la PKC chez une lignée d'astrocytes (HUNG et SUN, 2002). Par contre, un mécanisme de régulation du P2X₇R par la PKC n'est pas encore étudié. En effet, tous les récepteurs P2X possèdent un site consensus de phosphorylation par la PKC hautement conservé dans l'extrémité N-terminale (BOUÉ-GRABOT *et al.*, 2000). Une mutation de la thréonine¹⁸ en alanine du récepteur P2X₂ réduit sa désensibilisation (BOUÉ-GRABOT *et al.*, 2000), tandis la phosphorylation de Ser⁴⁸¹ par la PKA accélère la désensibilisation (CHOW et WANG, 1998). Une telle modulation n'est pas caractérisée chez le P2X₇R et serait donc un élément intéressant dans la l'étude de ce récepteur dans un contexte de la 4-AP.

Enfin, vu que l'interprétation des résultats obtenus avec les divers inhibiteurs du P2X₇R fut critiquée (HIBELL *et al.*, 2001b), l'identification récente d'un mutant dominant négatif du P2X₇R pourrait être un outil pour mieux déterminer l'implication de ce récepteur dans le mécanisme d'action de la 4-AP. Au fait, une double mutation WC167-168AA dans le domaine extracellulaire du P2X₇R produit des sous-unités non-fonctionnelles capables de réduire de 77% les courants ioniques du P2X₇R de type sauvage (RAOUF *et al.*, 2004). Aussi, ce mutant supprime l'entrée d'éthidium d'environ

30% (RAOUF *et al.*, 2004). Cela est intéressant, car bien que la queue C-terminale soit responsable de l'entrée de d'éthidium, on démontre que l'inactivation du pore ionique a un impact sur la formation subséquente du pore cytolytique. Vraisemblablement, le pore cytolytique dépendrait des flux ioniques engendrés par le P2X₇R, ce qui expliquerait un de nos résultats non-publiés où l'entrée d'éthidium était dépendante de la concentration de calcium extracellulaire variant entre 0 mM et 1.5 mM, ce qui ajoute à l'argumentation que le P2X₇R soit une cible de la 4-AP.

8.12 Mécanisme hypothétique global de la 4-AP

Nous pourrions raisonner et proposer que l'ICIA initial soit médié par le CRAC ou les TRP, activables par la 4-AP. L'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ activerait une ou plusieurs PKC, ou bien que la 4-AP activerait les PKC par un mécanisme direct ou indirect. Ensuite, les PKC actives réduiraient l'influx de Ca^{2+} par une action inhibitrice sur le CRAC/TRP d'une part, et déclencheraient une mort d'une autre part, possiblement par l'activation du P2X₇R qui possède un site potentiel de liaison aux PKC. Cette mort cellulaire est cytolytique (rapide) en premier temps, médiée par la formation du pore cytolytique P2X₇ et affectant les cellules fragiles ou endommagées. Les cellules résistantes à la cytolyse entrent dans un processus apoptotique (lent), médié probablement par la queue cytoplasmique du P2X₇R via le domaine apparenté au TNFR, ce qui recrute la caspase-8, son activation, puis le clivage de Bid. Des pores membranaires mitochondriaux se formeraient pour permettre la relâche du cytochrome c et le déclenchement irréversible de la cascade des caspases. De plus, une perte de $\Delta\Psi_m$ accélérerait l'apoptose via la voie intrinsèque.

Remerciements

J'aimerais remercier une foule de personnes qui ont contribué à mon succès durant mes études de doctorat, mais la liste serait longue. Alors, je me contenterai de remercier les personnes principales et j'exprimerai ma gratitude et ma reconnaissance pour ceux et celles qui ne seront pas mentionnés.

Je remercie ma famille, mon frère et mes sœurs pour leur support, et en particulier mes parents, Pénélope et Michel, pour tout leur amour, leurs sacrifices et leur encouragement, non seulement durant mes études de doctorat, mais durant toute ma vie jusqu'au jour présent.

Je remercie mes deux co-directeurs de projet pour m'avoir accepté et offert l'opportunité de réaliser mon doctorat en immunologie. Le Dr Gilles Dupuis, qui était mon professeur depuis mon baccalauréat en biochimie et ma maîtrise en immunologie, est devenu un mentor et un ami. Je le remercie infiniment pour tout son support, sa générosité, sa disponibilité et toutes les discussions enrichissantes, tant sur le plan scientifique que sur les sujets divers de la vie. Le Dr Marek Rola-Pleszczynski pour sa générosité, son support et sa confiance, les discussions fructueuses et les idées, tous des éléments qui m'ont aidé à diriger l'avenue de mes projets.

Aussi, un grand merci pour les professeurs du programme d'immunologie, pour leur apport scientifique sur les différents sujets de la Science, et tous les étudiants, passés et présents au sein du programme, pour leur camaraderie. Je ne les nommerai pas tous, mais je tiens à adresser ma gratitude à mes collègues Patrick Giguère, Brian Holleran et Alain Fleury pour leur amitié, les discussions, les sorties de ski, le *babyfoot*, les «tournois irréels», le McDo et le Burger King! Je remercie Amélie Perron, pour ses beaux yeux

verts, son amitié et les longues discussions sur tout et rien. Aussi, j'aimerais souligner ma gratitude à Driss Rochdi, pour son amitié, sa générosité et sa grande motivation à l'entraînement au gym. Et enfin, je remercie l'Université de Sherbrooke pour la qualité de ses enseignants et le bon environnement propice aux études qu'elle m'a procuré, ainsi que tous les gens que j'ai connus depuis mon baccalauréat.

Merci à tous.

Elie.

Bibliographie

- Abbas A.K., Lichtman A.H. et Pober J.S. (2000) *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- Abraham R.T., Ho S.N., Barna T.J., Rusovick K.M. et McKean D.J. (1988) Inhibition of T-cell antigen receptor-mediated transmembrane signaling by protein kinase C activation. *Mol Cell Biol* **8**:5448-5458.
- Acehan D., Jiang X., Morgan D.G., Heuser J.E., Wang X. et Akey C.W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* **9**:423-432.
- Adriouch S., Dox C., Welge V., Seman M., Koch-Nolte F. et Haag F. (2002) Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *J Immunol* **169**:4108-4112.
- Ahmed S.M., Rzigalinski B.A., Willoughby K.A., Sitterding H.A. et Ellis E.F. (2000) Stretch-induced injury alters mitochondrial membrane potential and cellular ATP in cultured astrocytes and neurons. *J Neurochem* **74**:1951-1960.
- Ahnadi C.E., Giguère P., Gravel S., Gagné D., Goulet A.C., Fülöp T., Jr., Payet M.D. et Dupuis G. (2000) Chronic PMA treatment of Jurkat T lymphocytes results in decreased protein tyrosine phosphorylation and inhibition of CD3- but not Ti-dependent antibody-triggered Ca²⁺ signaling. *J Leukoc Biol* **68**:293-300.
- Anderson J.M. (2000) Multinucleated giant cells. *Curr Opin Hematol* **7**:40-47.
- Andreani A., Leoni A., Locatelli A., Morigi R., Rambaldi M., Pietra C. et Villetti G. (2000) 4-Aminopyridine derivatives with anti-amnesic activity. *Eur J Med Chem* **35**:77-82.

- Ashe P.C. et Berry M.D. (2003) Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**:199-214.
- Ashkenazi A. et Dixit V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**:1305-1308.
- Aussel C., Pelassy C., Mary D., Choquet D. et Rossi B. (1990) Regulation of interleukin-2 production and phosphatidylserine synthesis in Jurkat T lymphocytes by K⁺ channel antagonists. *Immunopharmacology* **20**:97-103.
- Balasubramanyam M. et Gardner J.P. (1995) Protein kinase C modulates cytosolic free calcium by stimulating calcium pump activity in Jurkat T cells. *Cell Calcium* **18**:526-541.
- Balasubramanyam M., Kimura M., Aviv A. et Gardner J.P. (1993) Kinetics of calcium transport across the lymphocyte plasma membrane. *Am J Physiol* **265**:C321-327.
- Battaini F. (2001) Protein kinase C isoforms as therapeutic targets in nervous system disease states. *Pharmacol Res* **44**:353-361.
- Bazzi M.D. et Nelsestuen G.L. (1990) Protein kinase C interaction with calcium: a phospholipid-dependent process. *Biochemistry* **29**:7624-7630.
- Beeton C., Barbaria J., Giraud P., Devaux J., Benoliel A.M., Gola M., Sabatier J.M., Bernard D., Crest M. et Beraud E. (2001a) Selective blocking of voltage-gated K⁺ channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *J Immunol* **166**:936-944.
- Beeton C., Wulff H., Barbaria J., Clot-Faybesse O., Pennington M., Bernard D., Cahalan M.D., Chandy K.G. et Beraud E. (2001b) Selective blockade of T lymphocyte K⁺

- channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:13942-13947.
- Benton B.J., Keller S.A., Spriggs D.L., Capacio B.R. et Chang F.C. (1998) Recovery from the lethal effects of saxitoxin: a therapeutic window for 4-aminopyridine (4-AP). *Toxicon* **36**:571-588.
- Berridge M.J. (1995) Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Ann N Y Acad Sci* **766**:31-43.
- Berridge M.J., Lipp P. et Bootman M.D. (2000a) Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science* **287**:1604-1605.
- Berridge M.J., Lipp P. et Bootman M.D. (2000b) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**:11-21.
- Bever C.T., Jr., Young D., Anderson P.A., Krumholz A., Conway K., Leslie J., Eddington N., Plaisance K.I., Panitch H.S., Dhib-Jalbut S. et al. (1994) The effects of 4-aminopyridine in multiple sclerosis patients: results of a randomized, placebo-controlled, double-blind, concentration-controlled, crossover trial. *Neurology* **44**:1054-1059.
- Bidère N. et Senik A. (2001) Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes: a minireview. *Apoptosis* **6**:371-375.
- Birnbaumer L., Zhu X., Jiang M., Boulay G., Peyton M., Vannier B., Brown D., Platano D., Sadeghi H., Stefani E. et Birnbaumer M. (1996) On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:15195-15202.

- Bo X., Schoepfer R. et Burnstock G. (2000) Molecular cloning and characterization of a novel ATP P2X receptor subtype from embryonic chick skeletal muscle. *J Biol Chem* **275**:14401-14407.
- Bondy B., Hofmann M., Muller-Spahn F., Witzko M. et Hock C. (1996) The PHA-induced calcium signal in lymphocytes is altered after blockade of K⁺-channels in Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res* **30**:217-227.
- Boué-Grabot E., Archambault V. et Séguéla P. (2000) A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X₂ ATP-gated channels. *J Biol Chem* **275**:10190-10195.
- Bourguignon L.Y., Chu A., Jin H. et Brandt N.R. (1995) Ryanodine receptor-ankyrin interaction regulates internal Ca²⁺ release in mouse T-lymphoma cells. *J Biol Chem* **270**:17917-17922.
- Brandsgaard R., Barrett J.E. et Rosenzweig-Lipson S. (2000) Pharmacological characterization of the discriminative stimulus effects of the potassium channel blocker 4-aminopyridine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **295**:382-391.
- Brodie C. et Blumberg P.M. (2003) Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta. *Apoptosis* **8**:19-27.
- Bromley S.K., Burack W.R., Johnson K.G., Somersalo K., Sims T.N., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S., Allen P.M. et Dustin M.L. (2001) The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* **19**:375-396.
- Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X. et Wang X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**:269-290.

- Bulavka V.N. et Boiko I.I. (2000) Synthesis of 4-aminopyridine and 4-acetylaminopyridine by reduction of 4-nitropyridine-N-oxide with iron and mineral acids, in *Proceedings of ECSOC-4, The Fourth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, <http://www.mdpi.org/ecsoc-4.htm>, September 1-30, 2000 (Thomas Wirth COK, Eduard Felder, Ulf Diederichsen and Shu-Kun Lin ed), MDPI, Basel, Switzerland.
- Burley J.R. et Sihra T.S. (2000) A modulatory role for protein phosphatase 2B (calcineurin) in the regulation of Ca^{2+} entry. *Eur J Neurosci* **12**:2881-2891.
- Burnstock G. (2000) P2X receptors in sensory neurones. *Br J Anaesth* **84**:476-488.
- Cahalan M.D., Wulff H. et Chandy K.G. (2001) Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J Clin Immunol* **21**:235-252.
- Carafoli E. et Stauffer T. (1994) The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J Neurobiol* **25**:312-324.
- Cardenas M.E. et Heitman J. (1995) Role of calcium in T-lymphocyte activation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **30**:281-298.
- Chambers T.J. (1978) Multinucleate giant cells. *J Pathol* **126**:125-148.
- Chang F.C., Bauer R.M., Benton B.J., Keller S.A. et Capacio B.R. (1996) 4-Aminopyridine antagonizes saxitoxin-and tetrodotoxin-induced cardiorespiratory depression. *Toxicon* **34**:671-690.
- Chen H.M., Lin C.H. et Wang T.M. (1996) Effects of 4-aminopyridine on saxitoxin intoxication. *Toxicol Appl Pharmacol* **141**:44-48.

- Chessell I.P., Simon J., Hibell A.D., Michel A.D., Barnard E.A. et Humphrey P.P. (1998) Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor. *FEBS Lett* **439**:26-30.
- Chiozzi P., Sanz J.M., Ferrari D., Falzoni S., Aleotti A., Buell G.N., Collo G. et Di Virgilio F. (1997) Spontaneous cell fusion in macrophage cultures expressing high levels of the P2Z/P2X7 receptor. *J Cell Biol* **138**:697-706.
- Chizh B.A. et Illes P. (2001) P2X receptors and nociception. *Pharmacol Rev* **53**:553-568.
- Chopra R.K., Nagel J.E., Chrest F.J., Boto W.M., Pyle R.S., Dorsey B., McCoy M., Holbrook N. et Adler W.H. (1987) Regulation of interleukin 2 and interleukin 2 receptor gene expression in human T cells: I. Effect of Ca²⁺-ionophore on phorbol myristate acetate co-stimulated cells. *Clin Exp Immunol* **69**:433-440.
- Chow Y.W. et Wang H.L. (1998) Functional modulation of P2X2 receptors by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* **70**:2606-2612.
- Chung M.K., Lee H., Mizuno A., Suzuki M. et Caterina M.J. (2004) 2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J Neurosci* **24**:5177-5182.
- Chused T.M., Apasov S. et Sitkovsky M. (1996) Murine T lymphocytes modulate activity of an ATP-activated P2Z-type purinoceptor during differentiation. *J Immunol* **157**:1371-1380.
- Clapham D.E. (1995) Calcium signaling. *Cell* **80**:259-268.
- Clapham D.E. (1996) TRP is cracked but is CRAC TRP? *Neuron* **16**:1069-1072.
- Clapham D.E. (2002) Sorting out MIC, TRP, and CRAC Ion Channels. *J Gen Physiol* **120**:217-220.

- Clapham D.E., Runnels L.W. et Strubing C. (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* **2**:387-396.
- Cockcroft S. et Gomperts B.D. (1979) Activation and inhibition of calcium-dependent histamine secretion by ATP ions applied to rat mast cells. *J Physiol* **296**:229-243.
- Coleman M.L., Sahai E.A., Yeo M., Bosch M., Dewar A. et Olson M.F. (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* **3**:339-345.
- Collo G., Neidhart S., Kawashima E., Kosco-Vilbois M., North R.A. et Buell G. (1997) Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* **36**:1277-1283.
- Coronado R., Morrisette J., Sukhareva M. et Vaughan D.M. (1994) Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* **266**:C1485-1504.
- Cryns V. et Yuan J. (1998) Proteases to die for. *Genes Dev* **12**:1551-1570.
- Csutora P., Su Z., Kim H.Y., Bugrim A., Cunningham K.W., Nuccitelli R., Keizer J.E., Hanley M.R., Blalock J.E. et Marchase R.B. (1999) Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:121-126.
- Cui J., Bian J.S., Kagan A. et McDonald T.V. (2002) CaT1 contributes to the stores-operated calcium current in Jurkat T-lymphocytes. *J Biol Chem*.
- DeCoursey T.E., Chandy K.G., Gupta S. et Cahalan M.D. (1984) Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* **307**:465-468.
- Dempsey E.C., Newton A.C., Mochly-Rosen D., Fields A.P., Reyland M.E., Insel P.A. et Messing R.O. (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**:L429-438.

- Deuchars S.A., Atkinson L., Brooke R.E., Musa H., Milligan C.J., Batten T.F., Buckley N.J., Parson S.H. et Deuchars J. (2001) Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* **21**:7143-7152.
- Di Virgilio F. (1995) The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today* **16**:524-528.
- Di Virgilio F., Chiozzi P., Falzoni S., Ferrari D., Sanz J.M., Venketaraman V. et Baricordi O.R. (1998) Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ* **5**:191-199.
- Di Virgilio F., Chiozzi P., Ferrari D., Falzoni S., Sanz J.M., Morelli A., Torboli M., Bolognesi G. et Baricordi O.R. (2001) Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* **97**:587-600.
- Dock M., Ben Ali A., Karras A., Misset B., Garrouste-Orgeas M., Deletie E., Goldstein F. et Carlet J. (2002) Treatment of severe botulism with 3,4-diaminopyridine. *Presse Med* **31**:601-602.
- Dolmetsch R.E., Xu K. et Lewis R.S. (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* **392**:933-936.
- Donovan M. et Cotter T.G. (2004) Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* **1644**:133-147.
- Drukarch B., Kits K.S., Leysen J.E., Schepens E. et Stoof J.C. (1989) Restricted usefulness of tetraethylammonium and 4-aminopyridine for the characterization of receptor-operated K⁺-channels. *Br J Pharmacol* **98**:113-118.

- Du C., Fang M., Li Y., Li L. et Wang X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**:33-42.
- Dubyak G.R. et El-Moatassim C. (1993) Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* **265**:C577-606.
- Dustin M.L. (2002) The immunological synapse. *Arthritis Res* **4 Suppl 3**:S119-125.
- Dustin M.L. et Shaw A.S. (1999) Costimulation: building an immunological synapse. *Science* **283**:649-650.
- Earnshaw W.C., Martins L.M. et Kaufmann S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**:383-424.
- Eschke D., Wust M., Hauschildt S. et Nieber K. (2002) Pharmacological characterization of the P2X7 receptor on human macrophages using the patch-clamp technique. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **365**:168-171.
- Esposti M.D. (2002) The roles of Bid. *Apoptosis* **7**:433-440.
- Fadeel B., Gleiss B., Hogstrand K., Chandra J., Wiedmer T., Sims P.J., Henter J.I., Orrenius S. et Samali A. (1999) Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem Biophys Res Commun* **266**:504-511.
- Fairbairn I.P., Stober C.B., Kumararatne D.S. et Lammas D.A. (2001) ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X7-dependent

- process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. *J Immunol* **167**:3300-3307.
- Falzone S., Chiozzi P., Ferrari D., Buell G. et Di Virgilio F. (2000) P2X7 receptor and polykation formation. *Mol Biol Cell* **11**:3169-3176.
- Fanger C.M., Hoth M., Crabtree G.R. et Lewis R.S. (1995) Characterization of T cell mutants with defects in capacitative calcium entry: genetic evidence for the physiological roles of CRAC channels. *J Cell Biol* **131**:655-667.
- Fasolato C., Hoth M. et Penner R. (1993) A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *J Biol Chem* **268**:20737-20740.
- Ferrari D., Los M., Bauer M.K., Vandenabeele P., Wesselborg S. et Schulze-Osthoff K. (1999) P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett* **447**:71-75.
- Feske S., Giltner J., Dolmetsch R., Staudt L.M. et Rao A. (2001) Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* **2**:316-324.
- Fischer B.S., Qin D., Kim K. et McDonald T.V. (2001) Capsaicin inhibits Jurkat T-cell activation by blocking calcium entry current I(CRAC). *J Pharmacol Exp Ther* **299**:238-246.
- Fomina A.F., Fanger C.M., Kozak J.A. et Cahalan M.D. (2000) Single channel properties and regulated expression of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels in human T cells. *J Cell Biol* **150**:1435-1444.
- Franzios D., Hoth M. et Penner R. (1994) Non-specific effects of calcium entry antagonists in mast cells. *Pflugers Arch* **428**:433-438.

- Fujihara K. et Miyoshi T. (1998) The effects of 4-aminopyridine on motor evoked potentials in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* **159**:102-106.
- Gartland A., Buckley K.A., Bowler W.B. et Gallagher J.A. (2003) Blockade of the pore-forming P2X7 receptor inhibits formation of multinucleated human osteoclasts in vitro. *Calcif Tissue Int* **73**:361-369.
- Gomez-Angelats M., Bortner C.D. et Cidlowski J.A. (2000) Cell volume regulation in immune cell apoptosis. *Cell Tissue Res* **301**:33-42.
- Grafton G. et Thwaite L. (2001) Calcium channels in lymphocytes. *Immunology* **104**:119-126.
- Grakoui A., Bromley S.K., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S., Allen P.M. et Dustin M.L. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**:221-227.
- Grimaldi M., Atzori M., Ray P. et Alkon D.L. (2001) Mobilization of calcium from intracellular stores, potentiation of neurotransmitter-induced calcium transients, and capacitative calcium entry by 4-aminopyridine. *J Neurosci* **21**:3135-3143.
- Groupe R.C.D.R. (2004) "Caspases", page web consultée en juillet 2004, <http://www.sghms.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/caspases.html>.
- Grover A.K. et Khan I. (1992) Calcium pump isoforms: diversity, selectivity and plasticity. Review article. *Cell Calcium* **13**:9-17.
- Gu B.J., Zhang W., Worthington R.A., Sluyter R., Dao-Ung P., Petrou S., Barden J.A. et Wiley J.S. (2001) A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem* **276**:11135-11142.

- Gu B.J., Zhang W.Y., Bendall L.J., Chessell I.P., Buell G.N. et Wiley J.S. (2000) Expression of P2X7 purinoceptors on human lymphocytes and monocytes: evidence for nonfunctional P2X7 receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**:C1189-1197.
- Guerini D. (1998a) The Ca²⁺ pumps and the Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *Biometals* **11**:319-330.
- Guerini D. (1998b) The significance of the isoforms of plasma membrane calcium ATPase. *Cell Tissue Res* **292**:191-197.
- Guo B.C. et Xu Y.H. (2001) Bcl-2 over-expression and activation of protein kinase C suppress the trail-induced apoptosis in Jurkat T cells. *Cell Res* **11**:101-106.
- Guse A.H. (1998) Ca²⁺ signaling in T-lymphocytes. *Crit Rev Immunol* **18**:419-448.
- Guse A.H., Berg I., da Silva C.P., Potter B.V. et Mayr G.W. (1997) Ca²⁺ entry induced by cyclic ADP-ribose in intact T-lymphocytes. *J Biol Chem* **272**:8546-8550.
- Guse A.H., da Silva C.P., Berg I., Skapenko A.L., Weber K., Heyer P., Hohenegger M., Ashamu G.A., Schulze-Koops H., Potter B.V. et Mayr G.W. (1999) Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* **398**:70-73.
- Guse A.H., da Silva C.P., Emmrich F., Ashamu G.A., Potter B.V. et Mayr G.W. (1995) Characterization of cyclic adenosine diphosphate-ribose-induced Ca²⁺ release in T lymphocyte cell lines. *J Immunol* **155**:3353-3359.
- Guse A.H., Roth E. et Emmrich F. (1993) Intracellular Ca²⁺ pools in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem J* **291** (Pt 2):447-451.

- Guse A.H., Roth E. et Emmrich F. (1994) Ca^{2+} release and Ca^{2+} entry induced by rapid cytosolic alkalinization in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem J* **301**:83-88.
- Gutcher I., Webb P.R. et Anderson N.G. (2003) The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell Mol Life Sci* **60**:1061-1070.
- Hahn J., Jung W., Kim N., Uhm D.Y. et Chung S. (2000) Characterization and regulation of rat microglial Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channel by protein kinases. *Glia* **31**:118-124.
- Hakamata Y., Nakai J., Takeshima H. et Imoto K. (1992) Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett* **312**:229-235.
- Hakamata Y., Nishimura S., Nakai J., Nakashima Y., Kita T. et Imoto K. (1994) Involvement of the brain type of ryanodine receptor in T-cell proliferation. *FEBS Lett* **352**:206-210.
- Hancock J.T., Desikan R. et Neill S.J. (2001) Does the redox status of cytochrome C act as a fail-safe mechanism in the regulation of programmed cell death? *Free Radic Biol Med* **31**:697-703.
- Haverstick D.M., Dicus M., Resnick M.S., Sando J.J. et Gray L.S. (1997) A role for protein kinase C β 1 in the regulation of Ca^{2+} entry in Jurkat T cells. *J Biol Chem* **272**:15426-15433.
- Hayes K.C., Potter P.J., Hansebout R.R., Bugaresti J.M., Hsieh J.T., Nicosia S., Katz M.A., Blight A.R. et Cohen R. (2003) Pharmacokinetic studies of single and multiple oral doses of fampridine-SR (sustained-release 4-aminopyridine) in patients with chronic spinal cord injury. *Clin Neuropharmacol* **26**:185-192.

- Hayes K.C., Potter P.J., Hsieh J.T., Katz M.A., Blight A.R. et Cohen R. (2004) Pharmacokinetics and safety of multiple oral doses of sustained-release 4-aminopyridine (Fampridine-SR) in subjects with chronic, incomplete spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* **85**:29-34.
- Healy J.I., Dolmetsch R.E., Lewis R.S. et Goodnow C.C. (1998) Quantitative and qualitative control of antigen receptor signalling in tolerant B lymphocytes. *Novartis Found Symp* **215**:137-144; discussion 144-135, 186-190.
- Hengartner M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**:770-776.
- Hibell A.D., Thompson K.M., Simon J., Xing M., Humphrey P.P. et Michel A.D. (2001a) Species- and agonist-dependent differences in the deactivation-kinetics of P2X7 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **363**:639-648.
- Hibell A.D., Thompson K.M., Xing M., Humphrey P.P. et Michel A.D. (2001b) Complexities of measuring antagonist potency at P2X7 receptor orthologs. *J Pharmacol Exp Ther* **296**:947-957.
- Hirsh J.K. et Quandt F.N. (1993) Aminopyridine block of potassium channels in mouse neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* **267**:604-611.
- Hogquist K.A., Nett M.A., Unanue E.R. et Chaplin D.D. (1991) Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:8485-8489.
- Hohenegger M., Berg I., Weigl L., Mayr G.W., Potter B.V. et Guse A.H. (1999) Pharmacological activation of the ryanodine receptor in Jurkat T-lymphocytes. *Br J Pharmacol* **128**:1235-1240.

- Hosoi E., Nishizaki C., Gallagher K.L., Wyre H.W., Matsuo Y. et Sei Y. (2001) Expression of the ryanodine receptor isoforms in immune cells. *J Immunol* **167**:4887-4894.
- Hoth M. et Penner R. (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**:353-356.
- Hoth M. et Penner R. (1993) Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol* **465**:359-386.
- Hug H. et Sarre T.F. (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* **291** (Pt 2):329-343.
- Humphreys B.D., Virginio C., Surprenant A., Rice J. et Dubyak G.R. (1998) Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol Pharmacol* **54**:22-32.
- Hung A.C. et Sun S.H. (2002) The P2X7 receptor-mediated phospholipase D activation is regulated by both PKC-dependent and PKC-independent pathways in a rat brain-derived Type-2 astrocyte cell line, RBA-2. *Cell Signal* **14**:83-92.
- Imagawa T., Smith J.S., Coronado R. et Campbell K.P. (1987) Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca²⁺-permeable pore of the calcium release channel. *J Biol Chem* **262**:16636-16643.
- Isakov N. et Altman A. (2002) Protein kinase C(θ) in T cell activation. *Annu Rev Immunol* **20**:761-794.
- Ishikawa J., Ohga K., Yoshino T., Takezawa R., Ichikawa A., Kubota H. et Yamada T. (2003) A pyrazole derivative, YM-58483, potently inhibits store-operated

- sustained Ca^{2+} influx and IL-2 production in T lymphocytes. *J Immunol* **170**:4441-4449.
- Jaken S. et Parker P.J. (2000) Protein kinase C binding partners. *Bioessays* **22**:245-254.
- Jensen B.S., Odum N., Jorgensen N.K., Christophersen P. et Olesen S.P. (1999) Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:10917-10921.
- Jensik P.J., Holbird D., Collard M.W. et Cox T.C. (2001) Cloning and characterization of a functional P2X receptor from larval bullfrog skin. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**:C954-962.
- Jiang L.H., Kim M., Spelta V., Bo X., Surprenant A. et North R.A. (2003) Subunit arrangement in P2X receptors. *J Neurosci* **23**:8903-8910.
- Jiang L.H., Mackenzie A.B., North R.A. et Surprenant A. (2000) Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X7 receptors. *Mol Pharmacol* **58**:82-88.
- Kehl S.J. et McBurney R.N. (1989) The firing patterns of rat melanotrophs recorded using the patch clamp technique. *Neuroscience* **33**:579-586.
- Khakh B.S., Burnstock G., Kennedy C., King B.F., North R.A., Séguéla P., Voigt M. et Humphrey P.P. (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* **53**:107-118.
- Kilpatrick L.E., Lee J.Y., Haines K.M., Campbell D.E., Sullivan K.E. et Korchak H.M. (2002) A role for PKC-delta and PI 3-kinase in TNF-alpha-mediated antiapoptotic signaling in the human neutrophil. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**:C48-57.

- Kim M., Jiang L.H., Wilson H.L., North R.A. et Surprenant A. (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *Embo J* **20**:6347-6358.
- Kirsch G.E. et Narahashi T. (1983) Site of action and active form of aminopyridines in squid axon membranes. *J Pharmacol Exp Ther* **226**:174-179.
- Kirsch G.E., Yeh J.Z. et Oxford G.S. (1986) Modulation of aminopyridine block of potassium currents in squid axon. *Biophys J* **50**:637-644.
- Klapperstück M., Büttner C., Bohm T., Schmalzing G. et Markwardt F. (2000) Characteristics of P2X7 receptors from human B lymphocytes expressed in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* **1467**:444-456.
- Klapperstück M., Büttner C., Schmalzing G. et Markwardt F. (2001) Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X7 receptor. *J Physiol* **534**:25-35.
- Kluck R.M., Martin S.J., Hoffman B.M., Zhou J.S., Green D.R. et Newmeyer D.D. (1997) Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J* **16**:4639-4649.
- Köhler C., Orrenius S. et Zhivotovsky B. (2002) Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods* **265**:97-110.
- Koike Y., Ozaki Y., Qi R., Satoh K., Kurota K., Yatomi Y. et Kume S. (1994) Phosphatase inhibitors suppress Ca²⁺ influx induced by receptor-mediated intracellular Ca²⁺ store depletion in human platelets. *Cell Calcium* **15**:381-390.
- Koo G.C., Blake J.T., Talento A., Nguyen M., Lin S., Sirotina A., Shah K., Mulvany K., Hora D., Jr., Cunningham P., Wunderler D.L., McManus O.B., Slaughter R., Bugianesi R., Felix J., Garcia M., Williamson J., Kaczorowski G., Sigal N.H.,

- Springer M.S. et Feeney W. (1997) Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J Immunol* **158**:5120-5128.
- Kotturi M.F., Carlow D.A., Lee J.C., Ziltener H.J. et Jefferies W.A. (2003) Identification and functional characterization of voltage-dependent calcium channels in T lymphocytes. *J Biol Chem* **278**:46949-46960.
- Krebs J. (1998) The role of calcium in apoptosis. *Biometals* **11**:375-382.
- Kroemer G., Dallaporta B. et Resche-Rigon M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* **60**:619-642.
- Lajdova I., Chorvat D., Jr., Spustova V. et Chorvatova A. (2004) 4-aminopyridine activates calcium influx through modulation of the pore-forming purinergic receptor in human peripheral blood mononuclear cells. *Can J Physiol Pharmacol* **82**:50-56.
- Laliberté R., Perregaux D., Svensson L., Pazoles C.J. et Gabel C.A. (1994) Tenidap modulates cytoplasmic pH and inhibits anion transport in vitro. II. Inhibition of IL-1 beta production from ATP-treated monocytes and macrophages. *J Immunol* **153**:2168-2179.
- Larini F., Menegazzi P., Baricordi O., Zorzato F. et Treves S. (1995) A ryanodine receptor-like Ca²⁺ channel is expressed in nonexcitable cells. *Mol Pharmacol* **47**:21-28.
- Le Feuvre R., Brough D. et Rothwell N. (2002a) Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. *Eur J Pharmacol* **447**:261-269.
- Le Feuvre R.A., Brough D., Iwakura Y., Takeda K. et Rothwell N.J. (2002b) Priming of Macrophages with Lipopolysaccharide Potentiates P2X7-mediated Cell Death via

- a Caspase-1-dependent Mechanism, Independently of Cytokine Production. *J Biol Chem* **277**:3210-3218.
- Le K.T., Babinski K. et Séguéla P. (1998) Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci* **18**:7152-7159.
- Ledbetter M.W., Preiner J.K., Louis C.F. et Mickelson J.R. (1994) Tissue distribution of ryanodine receptor isoforms and alleles determined by reverse transcription polymerase chain reaction. *J Biol Chem* **269**:31544-31551.
- Lemeignan M., Millart H., Lamiable D., Molgo J. et Lechat P. (1984) Evaluation of 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine penetrability into cerebrospinal fluid in anesthetized rats. *Brain Res* **304**:166-169.
- Lewis R.S. (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **19**:497-521.
- Lewis R.S. et Cahalan M.D. (1989) Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells. *Cell Regul* **1**:99-112.
- Lewis R.S. et Cahalan M.D. (1995) Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **13**:623-653.
- Li L. et Zhang Y.P. (1994) Therapy of experimental autoimmune myasthenia gravis in rabbits with 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **15**:358-362.
- Liang H. et Fesik S.W. (1997) Three-dimensional structures of proteins involved in programmed cell death. *J Mol Biol* **274**:291-302.
- Lin C.S., Boltz R.C., Blake J.T., Nguyen M., Talento A., Fischer P.A., Springer M.S., Sigal N.H., Slaughter R.S., Garcia M.L. et al. (1993) Voltage-gated potassium

- channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation. *J Exp Med* **177**:637-645.
- Liston P., Fong W.G. et Korneluk R.G. (2003) The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* **22**:8568-8580.
- Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R. et Wang X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**:147-157.
- Loeffler M. et Kroemer G. (2000) The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* **256**:19-26.
- Ly J.D., Grubb D.R. et Lawen A. (2003) The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* **8**:115-128.
- Lytton J., Westlin M. et Hanley M.R. (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* **266**:17067-17071.
- MacKinnon R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett* **555**:62-65.
- Mahaut-Smith M.P., Tolhurst G. et Evans R.J. (2004) Emerging roles for P2X1 receptors in platelet activation. *Platelets* **15**:131-144.
- Martinez-Valdez H., Doherty P.J., Thompson E., Benedict S.H., Gelfand E.W. et Cohen A. (1988) Antagonistic effects of calcium ionophores and phorbol esters on T cell receptor mRNA levels in human thymocytes. *J Immunol* **140**:361-366.
- Mei Y.A., Wu M.M., Huan C.L., Sun J.T., Zhou H.Q. et Zhang Z.H. (2000) 4-aminopyridine, a specific blocker of K⁺ channels, inhibited inward Na⁺ current in rat cerebellar granule cells. *Brain Res* **873**:46-53.

- Mellor H. et Parker P.J. (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* **332** (Pt 2):281-292.
- Michel A.D., Kaur R., Chessell I.P. et Humphrey P.P. (2000) Antagonist effects on human P2X(7) receptor-mediated cellular accumulation of YO-PRO-1. *Br J Pharmacol* **130**:513-520.
- Mikoshiba K. (1993) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Trends Pharmacol Sci* **14**:86-89.
- Mochly-Rosen D., Khaner H. et Lopez J. (1991) Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:3997-4000.
- Molgo J. et Guglielmi J.M. (1996) 3,4-Diaminopyridine, an orphan drug, in the symptomatic treatment of Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Pflugers Arch* **431**:R295-296.
- Molgo J., Lemeignan M., Peradejordi F. et Lechat P. (1985) Presynaptic effects of aminopyridines on the neuromuscular junction of vertebrates. *J Pharmacol* **16**:109-144.
- Monkawa T., Miyawaki A., Sugiyama T., Yoneshima H., Yamamoto-Hino M., Furuichi T., Saruta T., Hasegawa M. et Mikoshiba K. (1995) Heterotetrameric complex formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subunits. *J Biol Chem* **270**:14700-14704.
- Montell C., Birnbaumer L., Flockerzi V., Bindels R.J., Bruford E.A., Caterina M.J., Clapham D.E., Harteneck C., Heller S., Julius D., Kojima I., Mori Y., Penner R., Prawitt D., Scharenberg A.M., Schultz G., Shimizu N. et Zhu M.X. (2002) A

- unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* **9**:229-231.
- Muñoz-Caro C. et Niño A. (2002) The nature of the receptor site for the reversible K⁺ channel blocking by aminopyridines. *Biophys Chem* **96**:1-14.
- Murata K., Sakon M., Kambayashi J., Yukawa M., Yano Y., Fujitani K., Kawasaki T., Shiba E. et Mori T. (1993) The possible involvement of protein phosphatase 1 in thrombin-induced Ca²⁺ influx of human platelets. *J Cell Biochem* **51**:442-445.
- Muzio M., Stockwell B.R., Stennicke H.R., Salvesen G.S. et Dixit V.M. (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273**:2926-2930.
- Naemsch L.N., Dixon S.J. et Sims S.M. (2001) Activity-dependent development of p2x₇ current and ca²⁺ entry in rabbit osteoclasts. *J Biol Chem* **276**:39107-39114.
- Nagata S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* **256**:12-18.
- Nakashima Y., Nishimura S., Maeda A., Barsoumian E.L., Hakamata Y., Nakai J., Allen P.D., Imoto K. et Kita T. (1997) Molecular cloning and characterization of a human brain ryanodine receptor. *FEBS Lett* **417**:157-162.
- Nieber K., Eschke D. et Brand A. (1999) Brain hypoxia: effects of ATP and adenosine. *Prog Brain Res* **120**:287-297.
- Niño A., Muñoz-Caro C., Carbó-Dorca R. et Gironés X. (2003) Rational modelling of the voltage-dependent K⁺ channel inactivation by aminopyridines. *Biophys Chem* **104**:417-427.
- Nordstrom T., Stahls A., Pessa-Morikawa T., Mustelin T. et Andersson L.C. (1990) Phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) blocks CD3-mediated Ca²⁺ mobilization

- in Jurkat T cells independently of protein kinase C activation. *Biochem Biophys Res Commun* **173**:396-400.
- North R.A. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* **82**:1013-1067.
- North R.A. (2003) The P2X3 subunit: a molecular target in pain therapeutics. *Curr Opin Investig Drugs* **4**:833-840.
- Nucifora F.C., Jr., Sharp A.H., Milgram S.L. et Ross C.A. (1996) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in endocrine cells: localization and association in hetero- and homotetramers. *Mol Biol Cell* **7**:949-960.
- Papp L., Balazsa T., Kofalvi A., Erdelyi F., Szabo G., Vizi E.S. et Sperlagh B. (2004) P2X receptor activation elicits transporter-mediated noradrenaline release from rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther.*
- Parekh A.B. et Penner R. (1995) Depletion-activated calcium current is inhibited by protein kinase in RBL-2H3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7907-7911.
- Pears C.J., Kour G., House C., Kemp B.E. et Parker P.J. (1990) Mutagenesis of the pseudosubstrate site of protein kinase C leads to activation. *Eur J Biochem* **194**:89-94.
- Philipson K.D. et Nicoll D.A. (1992) Sodium-calcium exchange. *Curr Opin Cell Biol* **4**:678-683.
- Pinter M.J., Waldeck R.F., Cope T.C. et Cork L.C. (1997) Effects of 4-aminopyridine on muscle and motor unit force in canine motor neuron disease. *J Neurosci* **17**:4500-4507.
- Polman C.H., Bertelsmann F.W., de Waal R., van Diemen H.A., Uitdehaag B.M., van Loenen A.C. et Koetsier J.C. (1994a) 4-Aminopyridine is superior to 3,4-

- diaminopyridine in the treatment of patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* **51**:1136-1139.
- Polman C.H., Bertelsmann F.W., van Loenen A.C. et Koetsier J.C. (1994b) 4-aminopyridine in the treatment of patients with multiple sclerosis. Long-term efficacy and safety. *Arch Neurol* **51**:292-296.
- Prakriya M. et Lewis R.S. (2001) Potentiation and inhibition of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP3 receptors. *J Physiol* **536**:3-19.
- Putney J.W., Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**:1-12.
- Putney J.W., Jr. (1999) "Kissin' cousins": intimate plasma membrane-ER interactions underlie capacitative calcium entry. *Cell* **99**:5-8.
- Putney J.W., Jr., Broad L.M., Braun F.J., Lievremon J.P. et Bird G.S. (2001) Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci* **114**:2223-2229.
- Radford K.M., Virginio C., Surprenant A., North R.A. et Kawashima E. (1997) Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X2 and P2X3 receptors. *J Neurosci* **17**:6529-6533.
- Raju T.N. (2000) The Nobel chronicles. 1991 Erwin Neher (b 1944) and Bert Sakman (b 1942). *Lancet* **355**:1732.
- Ralevic V. et Burnstock G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* **50**:413-492.
- Randriamampita C. et Tsien R.Y. (1993) Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* **364**:809-814.

- Randriamampita C. et Tsien R.Y. (1995) Degradation of a calcium influx factor (CIF) can be blocked by phosphatase inhibitors or chelation of Ca^{2+} . *J Biol Chem* **270**:29-32.
- Raouf R., Chakfe Y., Blais D., Speelman A., Boué-Grabot E., Henderson D. et Séguéla P. (2004) Selective knock-down of P2X7 ATP receptor function by dominant-negative subunits. *Mol Pharmacol* **65**:646-654.
- Rasmusson R.L., Zhang Y., Campbell D.L., Comer M.B., Castellino R.C., Liu S., Morales M.J. et Strauss H.C. (1995) Molecular mechanisms of K^{+} channel blockade: 4-aminopyridine interaction with a cloned cardiac transient K^{+} ($\text{Kv}1.4$) channel. *Adv Exp Med Biol* **382**:11-22.
- Rassendren F., Buell G., Newbolt A., North R.A. et Surprenant A. (1997) Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *Embo J* **16**:3446-3454.
- Ricard I., Martel J., Dupuis L., Dupuis G. et Payet M.D. (1997a) A caffeine/ryanodine-sensitive Ca^{2+} pool is involved in triggering spontaneous variations of Ca^{2+} in Jurkat T lymphocytes by a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) mechanism. *Cell Signal* **9**:197-206.
- Ricard I., Payet M.D. et Dupuis G. (1997b) Clustering the adhesion molecules VLA-4 (CD49d/CD29) in Jurkat T cells or VCAM-1 (CD106) in endothelial (ECV 304) cells activates the phosphoinositide pathway and triggers Ca^{2+} mobilization. *Eur J Immunol* **27**:1530-1538.
- Riccio A., Mattei C., Kelsell R.E., Medhurst A.D., Calver A.R., Randall A.D., Davis J.B., Benham C.D. et Pangalos M.N. (2002) Cloning and functional expression of

- human short TRP7, a candidate protein for store-operated Ca^{2+} influx. *J Biol Chem* **277**:12302-12309.
- Robertson S.J., Ennion S.J., Evans R.J. et Edwards F.A. (2001) Synaptic P2X receptors. *Curr Opin Neurobiol* **11**:378-386.
- Rodriguez J. et Lazebnik Y. (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **13**:3179-3184.
- Ron D. et Kazanietz M.G. (1999) New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *Faseb J* **13**:1658-1676.
- Ross P.E. et Cahalan M.D. (1995) Ca^{2+} influx pathways mediated by swelling or stores depletion in mouse thymocytes. *J Gen Physiol* **106**:415-444.
- Ross P.E., Ehring G.R. et Cahalan M.D. (1997) Dynamics of ATP-induced calcium signaling in single mouse thymocytes. *J Cell Biol* **138**:987-998.
- Rossi D. et Sorrentino V. (2002) Molecular genetics of ryanodine receptors Ca^{2+} -release channels. *Cell Calcium* **32**:307-319.
- Rossini P.M., Pasqualetti P., Pozzilli C., Grasso M.G., Millefiorini E., Graceffa A., Carlesimo G.A., Zibellini G. et Caltagirone C. (2001) Fatigue in progressive multiple sclerosis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of oral 4-aminopyridine. *Mult Scler* **7**:354-358.
- Rousseau E., Smith J.S. et Meissner G. (1987) Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca^{2+} release channel. *Am J Physiol* **253**:C364-368.
- Rouzair-Dubois B. et Dubois J.M. (1998) K^{+} channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. *J Physiol* **510** (Pt 1):93-102.

- Sahara S., Aoto M., Eguchi Y., Imamoto N., Yoneda Y. et Tsujimoto Y. (1999) Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* **401**:168-173.
- Sakai T. et Ambudkar I.S. (1996) Role for protein phosphatase in the regulation of Ca²⁺ influx in parotid gland acinar cells. *Am J Physiol* **271**:C284-294.
- Santella L. (1998) The role of calcium in the cell cycle: facts and hypotheses. *Biochem Biophys Res Commun* **244**:317-324.
- Saraste A. (1999) Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz* **24**:189-195.
- Sarkadi B., Tordai A., Muller M. et Gardos G. (1990) Regulation of stimulus-induced calcium transport pathways in human T (Jurkat) lymphoblasts. *Mol Immunol* **27**:1297-1306.
- Sarker M., Ruiz-Ruiz C. et Lopez-Rivas A. (2001) Activation of protein kinase C inhibits TRAIL-induced caspases activation, mitochondrial events and apoptosis in a human leukemic T cell line. *Cell Death Differ* **8**:172-181.
- Sartorius U., Schmitz I. et Krammer P.H. (2001) Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *ChemBioChem* **2**:20-29.
- Savill J. et Fadok V. (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**:784-788.
- Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H. et Peter M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* **17**:1675-1687.

- Schafer E.W., Jr., Brunton R.B. et Cunningham D.J. (1973) A summary of the acute toxicity of 4-aminopyridine to birds and mammals. *Toxicol Appl Pharmacol* **26**:532-538.
- Schechtman D. et Mochly-Rosen D. (2001) Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene* **20**:6339-6347.
- Schindl R., Kahr H., Graz I., Groschner K. et Romanin C. (2002) Store depletion-activated CaT1 currents in rat basophilic leukemia mast cells are inhibited by 2-aminoethoxydiphenyl borate. Evidence for a regulatory component that controls activation of both CaT1 and CRAC (Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel) channels. *J Biol Chem* **277**:26950-26958.
- Schlegel R.A., Callahan M., Krahling S., Pradhan D. et Williamson P. (1996) Mechanisms for recognition and phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Adv Exp Med Biol* **406**:21-28.
- Schmied M., Breitschopf H., Gold R., Zischler H., Rothe G., Wekerle H. et Lassmann H. (1993) Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am J Pathol* **143**:446-452.
- Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S. et Peter M.E. (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* **254**:439-459.
- Schwarzmann N., Kunerth S., Weber K., Mayr G.W. et Guse A.H. (2002) Knock-down of the Type 3 Ryanodine Receptor Impairs Sustained Ca²⁺ Signaling via the T Cell Receptor/CD3 Complex. *J Biol Chem* **277**:50636-50642.

- Schwid S.R., Petrie M.D., McDermott M.P., Tierney D.S., Mason D.H. et Goodman A.D. (1997) Quantitative assessment of sustained-release 4-aminopyridine for symptomatic treatment of multiple sclerosis. *Neurology* **48**:817-821.
- Sebbagh M., Renvoize C., Hamelin J., Riche N., Bertoglio J. et Breard J. (2001) Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* **3**:346-352.
- Segal J.L., Pathak M.S., Hernandez J.P., Himber P.L., Brunnemann S.R. et Charter R.S. (1999) Safety and efficacy of 4-aminopyridine in humans with spinal cord injury: a long-term, controlled trial. *Pharmacotherapy* **19**:713-723.
- Sei Y. et Reich H. (1995) Thapsigargin induces IL-2 receptor alpha-chain in human peripheral and Jurkat T cells via a protein kinase C-independent mechanism. *Immunol Lett* **45**:75-80.
- Serafini A.T., Lewis R.S., Clipstone N.A., Bram R.J., Fanger C., Fiering S., Herzenberg L.A. et Crabtree G.R. (1995) Isolation of mutant T lymphocytes with defects in capacitative calcium entry. *Immunity* **3**:239-250.
- Shieh C.C., Coghlan M., Sullivan J.P. et Gopalakrishnan M. (2000) Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* **52**:557-594.
- Shivnan E. et Alexander D.R. (1995) Protein kinase C activation inhibits TCR-mediated calcium influx but not inositol trisphosphate production in HPB-ALL T cells. *J Immunol* **154**:1146-1156.
- Sims P.J. et Wiedmer T. (2001) Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost* **86**:266-275.

- Sims T.N. et Dustin M.L. (2002) The immunological synapse: integrins take the stage. *Immunol Rev* **186**:100-117.
- Smani T., Zakharov S.I., Csutora P., Leno E., Trepakova E.S. et Bolotina V.M. (2004) A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol* **6**:113-120.
- Smart M.L., Gu B., Panchal R.G., Wiley J., Cromer B., Williams D.A. et Petrou S. (2003) P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J Biol Chem* **278**:8853-8860.
- Smith K.J., Felts P.A. et John G.R. (2000) Effects of 4-aminopyridine on demyelinated axons, synapses and muscle tension. *Brain* **123** (Pt 1):171-184.
- Spyker D.A., Lynch C., Shabanowitz J. et Sinn J.A. (1980) Poisoning with 4-aminopyridine: report of three cases. *Clin Toxicol* **16**:487-497.
- Stennicke H.R., Deveraux Q.L., Humke E.W., Reed J.C., Dixit V.M. et Salvesen G.S. (1999) Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* **274**:8359-8362.
- Strehler E.E. et Zacharias D.A. (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev* **81**:21-50.
- Sugawara H., Kurosaki M., Takata M. et Kurosaki T. (1997) Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *Embo J* **16**:3078-3088.
- Sun Y., Keay S., De Deyne P.G. et Chai T.C. (2001) Augmented stretch activated adenosine triphosphate release from bladder uroepithelial cells in patients with interstitial cystitis. *J Urol* **166**:1951-1956.

- Surprenant A., Rassendren F., Kawashima E., North R.A. et Buell G. (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* **272**:735-738.
- Takahashi R., Deveraux Q., Tamm I., Welsh K., Assa-Munt N., Salvesen G.S. et Reed J.C. (1998) A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* **273**:7787-7790.
- Takai Y., Kishimoto A., Inoue M. et Nishizuka Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem* **252**:7603-7609.
- Tartaglia L.A., Ayres T.M., Wong G.H. et Goeddel D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**:845-853.
- Tatham P.E. et Lindau M. (1990) ATP-induced pore formation in the plasma membrane of rat peritoneal mast cells. *J Gen Physiol* **95**:459-476.
- Thornberry N.A. et Lazebnik Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**:1312-1316.
- Thornberry N.A., Rano T.A., Peterson E.P., Rasper D.M., Timkey T., Garcia-Calvo M., Houtzager V.M., Nordstrom P.A., Roy S., Vaillancourt J.P., Chapman K.T. et Nicholson D.W. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* **272**:17907-17911.

- Tordai A., Sarkadi B., Gorog G. et Gardos G. (1989) Inhibition of the CD3-mediated calcium signal by protein kinase C activators in human T (Jurkat) lymphoblastoid cells. *Immunol Lett* **20**:47-52.
- Torres G.E., Egan T.M. et Voigt M.M. (1999a) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* **274**:6653-6659.
- Torres G.E., Egan T.M. et Voigt M.M. (1999b) Identification of a domain involved in ATP-gated ionotropic receptor subunit assembly. *J Biol Chem* **274**:22359-22365.
- Torres G.E., Haines W.R., Egan T.M. et Voigt M.M. (1998) Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol Pharmacol* **54**:989-993.
- Tsutsumi A., Kubo M., Fujii H., Freire-Moar J., Turck C.W. et Ransom J.T. (1993) Regulation of protein kinase C isoform proteins in phorbol ester-stimulated Jurkat T lymphoma cells. *J Immunol* **150**:1746-1754.
- Uehara K., Onoue H., Jeyakumar L.H., Fleischer S. et Uehara A. (2004) Localization of ryanodine receptor 3 in the sinus endothelial cells of the rat spleen. *Cell Tissue Res.*
- Vaur S., Bresson-Bepoldin L., Dufy B., Tuffet S. et Dufy-Barbe L. (1998) Potassium channel inhibition reduces cell proliferation in the GH3 pituitary cell line. *J Cell Physiol* **177**:402-410.
- Venkatachalam K., Zheng F. et Gill D.L. (2003) Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem* **278**:29031-29040.

- Verhoven B., Krahling S., Schlegel R.A. et Williamson P. (1999) Regulation of phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic T lymphocytes. *Cell Death Differ* **6**:262-270.
- Villalba M. et Altman A. (2002) Protein kinase C-theta (PKCtheta), a potential drug target for therapeutic intervention with human T cell leukemias. *Curr Cancer Drug Targets* **2**:125-137.
- Virginio C., Church D., North R.A. et Surprenant A. (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* **36**:1285-1294.
- Virginio C., MacKenzie A., North R.A. et Surprenant A. (1999) Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J Physiol* **519**:335-346.
- Voets T., Prenen J., Fleig A., Vennekens R., Watanabe H., Hoenderop J.G., Bindels R.J., Droogmans G., Penner R. et Nilius B. (2001) CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties. *J Biol Chem* **276**:47767-47770.
- Vucic D., Deshayes K., Ackerly H., Pisabarro M.T., Kadkhodayan S., Fairbrother W.J. et Dixit V.M. (2002) SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). *J Biol Chem* **277**:12275-12279.
- Walker N.P., Talanian R.V., Brady K.D., Dang L.C., Bump N.J., Ferez C.R., Franklin S., Ghayur T., Hackett M.C., Hammill L.D. et al. (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* **78**:343-352.

- Wang X.Q., Xiao A.Y., Yang A., LaRose L., Wei L. et Yu S.P. (2003) Block of Na⁺,K⁺-ATPase and induction of hybrid death by 4-aminopyridine in cultured cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **305**:502-506.
- Weismann M., Guse A.H., Sorokin L., Broker B., Frieser M., Hallmann R. et Mayr G.W. (1997) Integrin-mediated intracellular Ca²⁺ signaling in Jurkat T lymphocytes. *J Immunol* **158**:1618-1627.
- Wiley J.S., Dao-Ung L.P., Gu B.J., Sluyter R., Shemon A.N., Li C., Taper J., Gallo J. et Manoharan A. (2002) A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study. *Lancet* **359**:1114-1119.
- Witkowski J.M., Siebert J., Lukaszuk K. et Trawicka L. (1993) Comparison of effect of a panel of membrane channel blockers on the proliferative, cytotoxic and cytoadherence abilities of human peripheral blood lymphocytes. *Immunopharmacology* **26**:53-63.
- Wojcikiewicz R.J. et He Y. (1995) Type I, II and III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor co-immunoprecipitation as evidence for the existence of heterotetrameric receptor complexes. *Biochem Biophys Res Commun* **213**:334-341.
- Wolf B.B., Schuler M., Echeverri F. et Green D.R. (1999) Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem* **274**:30651-30656.

- Yamane T., Furukawa T. et Hiraoka M. (1995) 4-Aminopyridine block of the noninactivating cloned K⁺ channel Kv1.5 expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* **269**:H556-564.
- Yang X., Chang H.Y. et Baltimore D. (1998) Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* **281**:1355-1357.
- Yue L., Peng J.B., Hediger M.A. et Clapham D.E. (2001) CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature* **410**:705-709.
- Zachowski A., Favre E., Cribier S., Herve P. et Devaux P.F. (1986) Outside-inside translocation of aminophospholipids in the human erythrocyte membrane is mediated by a specific enzyme. *Biochemistry* **25**:2585-2590.
- Zipp F. (2000) Apoptosis in multiple sclerosis. *Cell Tissue Res* **301**:163-171.
- Zitt C., Strauss B., Schwarz E.C., Spaeth N., Rast G., Hatzelmann A. et Hoth M. (2004) Potent inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *J Biol Chem* **279**:12427-12437.